

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

Date of mailing (day/month/year)
03 November 2000 (03.11.00)
International application No.
PCT/JP00/01802
International filing date (day/month/year)
24 March 2000 (24.03.00)
Applicant
ITO, Makoto

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

17 August 2000 (17.08.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

□

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p>Kiwa Mpay</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
---	--

E P · U S

P C T

特許協力条約

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 00-011-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/01802	国際出願日 (日.月.年) 24.03.00	優先日 (日.月.年) 26.03.99
出願人(氏名又は名称) 寶酒造株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 - この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 - この国際出願に含まれる書面による配列表
 - この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 - 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 - 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 - 出願後に提出した書面による配列表が、出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 - 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は、 出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は 出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである. なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 2.0 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 2.0 は、人の身体の治療による処置方法であるから、
この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N9/80, C12N15/55, C12N15/63, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C12Q1/68, C12Q1/34, C07K16/40, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N9/80, C12N15/55, C12N15/63, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C12Q1/68, C12Q1/34, C07K16/40, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	BAWAB, S. E. et al. "Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain", J. Biol. Chem. (9月. 1999) 第274巻, 第39号 p. 27948-27955	1-19
P, X	TANI, M. et al. "Specific and sensitive assay for alkaline and neutral ceramidases involving C12-NBD-ceramide", J. Biochem. (4月. 1999) 第125巻, 第4号 p. 746-749	1-19

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 06. 00

国際調査報告の発送日

04.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

六笠 紀子

印 4B 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) 関連すると認められる文献	引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	Y	YADA, Y. et al. "Purification and biochemical characterization of membrane-bound epidermal ceramidases from guinea pig skin", J. Biol. Chem. (1995) 第270巻, 第21号 p. 12677-12684	1-19
	Y	NIKOLOVA-KARAKASHIAN, M. et al, "Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1 β ", J. Biol. Chem. (1997) 第272巻, 第30号 p. 18718-18724	1-19
	Y	HUWILER, A. et al, "Nitric oxide donors induce stress signaling via ceramide formation in rat renal mesangial cells", J. Biol. Chem. (12日.3月.1999) 第274巻, 第11号 p. 7190-7195	1-19
	A	JP, 10-257884, A(寶酒造株式会社) 29.9月.1998(29.09.98) パテントファミリー無し	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01802

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/80, C12N15/55, C12N15/63, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C12Q1/68, C12Q1/34, C07K16/40, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/80, C12N15/55, C12N15/63, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C12Q1/68, C12Q1/34, C07K16/40, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	BAWAB, S. E. et al., "Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain", J. Biol. Chem. (September, 1999, Vol.274, No.39, pp.27948-27955	1-19
P, X	TANI, M. et al., "Specific and sensitive assay for alkaline and neutral ceramidases involving C12-NBD-ceramide", J. Biochem. (April, 1999), Vol.125, No.4, pp.746-749	1-19
Y	YADA, Y. et al., "Purification and biochemical characterization of membrane-bound epidermal ceramidases from guinea pig skin", J. Biol. Chem. (1995), Vol.270, No.21, pp.12677-12684	1-19
Y	NIKOLOVA-KARAKASHIAN, M. et al, "Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1 β ", J. Biol. Chem. (1997), Vol.272, No.30, pp.18718-18724	1-19
Y	HUWILER, A. et al, "Nitric oxide donors induce stress signaling via ceramide formation in rat renal mesangial cells", J. Biol. Chem. (12 March, 1999), Vol.274, No.11, pp.7190-7195	1-19

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 June, 2000 (16.06.00)

Date of mailing of the international search report
04 July, 2000 (04.07.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01802

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 10-257884, A (Takara Shuzo Co., Ltd.), 29 September, 1998 (29.09.98), (Family: none)	1-19

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 00-011-PCT	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/01802	International filing date (day/month/year) 24 March 2000 (24.03.00)	Priority date (day/month/year) 26 March 1999 (26.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/80, 15/55, 15/63, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C12Q 1/68, 1/34, C07K 16/40, G01N 33/53		
Applicant TAKARA SHUZO CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:
I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II <input type="checkbox"/> Priority
III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 17 August 2000 (17.08.00)	Date of completion of this report 16 April 2001 (16.04.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01802

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- the international application as originally filed
 the description:

pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

- the claims:

pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

- the drawings:

pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

- the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
 the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
 the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- contained in the international application in written form.
 filed together with the international application in computer readable form.
 furnished subsequently to this Authority in written form.
 furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
 The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
 The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- the description, pages _____
 the claims, Nos. _____
 the drawings, sheets/fig _____

5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- the entire international application.
 claims Nos. _____ 20

because:

- the said international application, or the said claims Nos. _____ 20
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See supplemental sheet for continuation of Box III. 1.

- the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.
 no international search report has been established for said claims Nos. _____ 20

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
 the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

/JP 00/01802

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III. 1.

Claim 20 describes a method for treatment of the human body by therapy.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/01802

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Y. Yada et al., "Purification and biochemical characterization of membrane-bound ceramidases from guinea pig skin", J. Biol. Chem. (1995), Vol. 270, No. 21. 12677-12684

Document 2: M. Nikolova-Karakashian et al., "Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1 β ", J. Biol. Chem. (1997), Vol. 272, No. 30, pp. 18718-18724

Document 1 discloses the isolation and purification of ceramidase from guinea pig skin with an optimum pH of 7.0-10.0.

Document 2 discloses detection of acid and neutral ceramidase activity in rat liver after adding interleukin-1 β .

Documents 1 and 2 disclose mammalian ceramidase with an optimum pH in the neutral or alkaline range, and Document 2 discloses the presence of a neutral ceramidase in rodent liver. Therefore, a person skilled in the art could easily conceive of isolating and purifying a ceramidase as disclosed in Document 1 starting from rodent liver, determining a partial amino acid sequence, constructing a probe using the sequence thus determined, and screening genes.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/01802

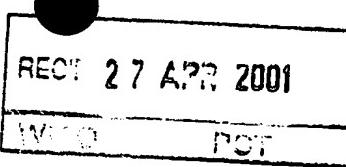
A person skilled in the art could also incorporate a resulting gene into a suitable vector and express the protein by transforming a host, create antibodies against the expressed protein and create antisense DNA from the gene sequence.

Therefore, the inventions described in Claims 1-19 could easily be invented by a person skilled in the art from Documents 1 and 2.

特許協力条約

PCT

国際予備審査報告



(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 00-011-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPOO/01802	国際出願日 (日.月.年) 24.03.00	優先日 (日.月.年) 26.03.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl? C12N 9/80, C12N 15/55, C12N 15/63, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02, C12Q 1/68, C12Q 1/34, C07K 16/40, G01N 33/53		
出願人（氏名又は名称） 寶酒造株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>4</u> ページからなる。
<input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対しても訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input checked="" type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 17.08.00	国際予備審査報告を作成した日 16.04.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 六笠 紀子  電話番号 03-3581-1101 内線 3448
	4B 9735

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

出願時の国際出願書類

明細書 第 _____ ページ、
明細書 第 _____ ページ、
明細書 第 _____ ページ、
出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの

請求の範囲 第 _____ 項、
請求の範囲 第 _____ 項、
請求の範囲 第 _____ 項、
請求の範囲 第 _____ 項、
出願時に提出されたもの
PCT19条の規定に基づき補正されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの

図面 第 _____ ページ/図、
図面 第 _____ ページ/図、
図面 第 _____ ページ/図、
出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの

明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

國際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
 PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

明細書 第 _____ ページ
 請求の範囲 第 _____ 項
 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

III. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

- 国際出願全体
 請求の範囲 20

理由 :

- この国際出願又は請求の範囲 20 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

人の身体の治療による処置方法

- 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

- 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

- 請求の範囲 20 について、国際調査報告が作成されていない。

2. スクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

- 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。
 フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-19 有
請求の範囲 無

進歩性 (I S)

請求の範囲 有
請求の範囲 1-19 無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1-19 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : YADA, Y. et al. "Purification and biochemical characterization of membrane-bound epidermal ceramidases from guinea pig skin", J. Biol. Chem. (1995) Vol. 270, No. 21, p. 12677-12684

文献2 : NIKOLOVA-KARAKASHIAN, M et al. "Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1 β ", J. Biol. Chem. (1997) Vol. 272, No. 30, p. 18718-18724

文献1には、モルモット皮膚からpH 7.0～10.0に至適pHを持つセラミダーゼを単離精製したことが記載されている。

文献2には、インターロイキン-1 β を添加することでラット肝臓に酸性及び中性のセラミダーゼ活性が検出されることが記載されている。

ここで文献1や2には中性乃至アルカリ性を至適pHにもつ哺乳類のセラミダーゼが記載されており、文献2には齧歯類の肝臓に中性セラミダーゼが存在することが記載されているから、齧歯類の肝臓を原料として引用文献1に記載されたようにセラミダーゼを単離精製し、部分アミノ酸配列を決定すること、こうして決定した配列をもとにプローブを作製し、遺伝子をスクリーニングすることは当業者が容易に想到し得たものと認める。

また、このようにして得られた遺伝子を適当なベクターに組み込んで宿主を形質転換して蛋白質を発現すること、発現した蛋白質に対する抗体を作製すること、遺伝子配列をもとにアンチセンスDNAを作製することは当業者が周知の手法を用いて適宜なし得たことである。

従って、請求の範囲1乃至19に係る発明は文献1及び2の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協定に基づいて公開された国出願



(51) 国際特許分類7 C12N 9/80, 15/55, 15/63, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C12Q 1/68, 1/34, C07K 16/40, G01N 33/53	A1	(11) 国際公開番号 WO00/58448
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01802		(43) 国際公開日 2000年10月5日(05.10.00)
(22) 国際出願日 2000年3月24日(24.03.00)		
(30) 優先権データ 特願平11/84743 1999年3月26日(26.03.99)	JP	(81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 資酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP] 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書
(72) 発明者 ; および (73) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 伊東 信(ITO, Makoto)[JP/JP] 〒819-0013 福岡県福岡市西区愛宕浜四丁目34-1 Fukuoka, (JP)		
(74) 代理人 弁理士 細田芳徳(HOSODA, Yoshinori) 〒540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大手前M2ビル 細田国際特許事務所内 Osaka, (JP)		

(54)Title: CERAMIDASE GENE

(54)発明の名称 セラミダーゼ遺伝子

(57) Abstract

A neutral/alkaline ceramidase originating in a mammal; an antibody binding specifically thereto; a gene encoding this ceramidase; a probe and a primer hybridizable specifically therewith; a genetic engineering process for producing the ceramidase; a method for detecting the ceramidase or its gene; and a method for controlling the ceramide content in cells and/or tissues; which are usefully applicable to-lipid engineering reagents for analyzing the structure and functions of ceramide, diseases in association with ceramide metabolism, etc.

(57)要約

哺乳類由来の中性・アルカリ性セラミダーゼ；それに特異的に結合する抗体；該セラミダーゼをコードする遺伝子；それに特異的にハイブリダイズするプローブ及びプライマー；該セラミダーゼの遺伝子工学的な製造方法；該セラミダーゼ又は遺伝子の検出方法並びに細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量の調節方法。本発明は、セラミドの構造や機能等を解析するための脂質工学用試薬、セラミドの代謝に関する疾患等への応用に有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SG スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴー
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサオ	ML マリ	TT トリニダッド・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	MN モンゴル	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MR モーリタニア	UA ウクライナ
CG コンゴー	ID インドネシア	MW マラウイ	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MX メキシコ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MZ モザンビーク	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	NE ニジェール	VN ベトナム
CN 中国	IS アイスランド	NL オランダ	YU ユーコスラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	PL ポーランド	
CZ チェコ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KR 韓国		

明細書

セラミダーゼ遺伝子

技術分野

本発明は、セラミドの構造や機能等を解析するための脂質工学用試薬として有用な、セラミダーゼ活性を有するポリペプチド、それに特異的に結合する抗体、該ポリペプチドをコードする遺伝子、それに特異的にハイブリダイズするプローブおよびプライマーに関する。また、本発明は、前記ポリペプチドの遺伝子工学的な製造方法、並びに該ポリペプチド又は遺伝子の検出方法及びそのキットに関する。さらに、本発明は、セラミド量の異常に起因する疾患への応用が可能な、細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量の調節方法に関する。

背景技術

セラミダーゼは、スフィンゴ脂質の一種であるセラミドをスフィンゴイドと脂肪酸に加水分解する酵素である。セラミドがセラミダーゼにより加水分解されて生成するスフィンゴイドは、プロテインキナーゼCの阻害、ホスフォリパーゼDの活性化、カルモジュリン依存性の酵素の阻害等の種々の生理活性を有する。このように、前記スフィンゴイドは、細胞の増殖や細胞内情報伝達に関与することにより、細胞機能の調節に働いていると考えられている重要な物質である。セラミダーゼは、前記スフィンゴイドの量の調節という重要な役割を担う酵素である。

セラミダーゼは、その至適pHにより酸性セラミダーゼ、中性・アルカリ性セラミダーゼに分類される。これまで酸性域に至適pHを有するセラミダーゼの存在は、ラット脳 [バイオケミストリー (Biochemistry)、第8巻、第1692～1698頁 (1969)]、モルモット上皮細胞 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミ

ストリー (J. Biol. Chem.) 、第270巻、第12677～12684頁 (1995)] 、ヒト腎臓 [バイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ (Biochim. Biophys. Acta) 、第398巻、第125～131頁 (1975)] 、脾臓 [バイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ、第1004巻、第245～251頁 (1989)] 、纖維芽細胞 [バイオケミカル・ジャーナル (Biochem. J.) 、第205巻、第419～425頁 (1982)] 、上皮 [フェブス・レターズ (FEBS Lett.) 、第268巻、第110～112頁 (1990)] 等の哺乳動物組織、ヒト尿 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第270巻、第11098～11102頁 (1995)] 等に報告されている。

また、シュードモナス属細菌がセラミダーゼを生産することが明らかにされており、該セラミダーゼは、アルカリ性域に至適pHを有するセラミダーゼである [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第273巻、第14368～14373頁 (1998)] 。

これらのセラミダーゼのうち、ヒト尿より精製された酸性セラミダーゼのアミノ酸配列及び該セラミダーゼをコードする遺伝子の塩基配列が決定されている [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第271巻、第33110～33115頁 (1996)] 。また、前記ヒト尿由来の酸性セラミダーゼ遺伝子との相同性を利用してマウスの酸性セラミダーゼ遺伝子が得られている [ジェノミックス (Genomics) 、第50巻、第267～274頁 (1998)] 。

しかしながら、報告されている哺乳類由来セラミダーゼ遺伝子は、いずれも酸性セラミダーゼをコードするものであり、哺乳類における中性・アルカリ性セラミダーゼのアミノ酸配列や遺伝子構造は全く知られておらず、高等生物における中性・アルカリ性セラミダーゼの生物学的機能も明らかにされていないのが現状である。

生体内におけるセラミドの機能の解明、その代謝の制御、セラミドに関連した疾病的診断、治療等の研究には、セラミドに関連する種々の酵素、並びに該酵素の遺伝子に関する詳細な情報を得る必要がある。しかしながら、上記のように哺

乳類における中性・アルカリ性セラミダーゼのアミノ酸配列、その遺伝子に関する知見は得られていないのが現状である。したがって、セラミドに関する上記のような技術を開発するためには中性・アルカリ性セラミダーゼ、特にその遺伝子に関する知見を得る必要がある。

上記のように、哺乳類のセラミダーゼ遺伝子のクローニングについて、いくつかの報告があるが、これらはいずれも酸性領域で活性を示すセラミダーゼであり、中性・アルカリ性で活性を示すセラミダーゼとの間には高いホモロジーを期待できない。このため、酸性セラミダーゼ遺伝子の塩基配列のホモローグとして中性・アルカリ性セラミダーゼ遺伝子を取得することは困難である。

発明の開示

本発明は、前記従来技術に鑑みてなされたものであり、第1の目的は、哺乳類の中性・アルカリ性セラミダーゼ遺伝子を提供することにある。本発明の第2の目的は、前記遺伝子を含む発現ベクターを導入した形質転換体を用いる遺伝子工学的に高純度の中性・アルカリ性セラミダーゼを製造する方法を提供することにある。本発明の第3の目的は、前記遺伝子がコードするポリペプチドを提供することにある。本発明の第4の目的は、本発明の遺伝子又はその一部に相補的なアンチセンスDNA及びアンチセンスRNAを提供することにある。本発明の第5の目的は、本発明の遺伝子に特異的にハイブリダイズする合成オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーを提供することにある。本発明の第6の目的は、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体又はその断片を提供することにある。本発明の第7の目的は、前記セラミダーゼ又はその遺伝子の検出方法及びそれに用いるキットを提供することにある。本発明の第8の目的は、細胞内または組織内におけるセラミド量の調節方法を提供することにある。

本発明者らは、哺乳類であるマウス肝臓から、中性・アルカリ性セラミダーゼを単離し、その遺伝子を単離することに成功した。また、ハイブリダイゼーション

ンやポリメラーゼ・チェイン・リアクション（PCR）などの手法を用いることにより、ヒトを含む哺乳類の中性・アルカリ性セラミダーゼの構造を解明することに成功した。更に該遺伝子を用いて、遺伝子工学的手法により高純度な中性・アルカリ性セラミダーゼを簡便に製造することにも成功し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明の要旨は、

- (1) (A) 配列表の配列番号：14に記載のアミノ酸配列又はその一部をしてなるポリペプチドであって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；
(B) 配列表の配列番号：15に記載の塩基配列又はその一部を有する核酸であって、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；
(C) 配列表の配列番号：14に記載のアミノ酸配列において、少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換を有するアミノ酸配列からなり、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；
(D) 配列表の配列番号：15に記載の塩基配列において、少なくとも1つの塩基の欠失、付加、挿入又は置換を有する塩基配列からなり、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；並びに
(E) 前記(A)～(D) いずれか記載の核酸の相補鎖とストリンジェントな条件下にハイブリダイズしうる核酸であって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸、
(F) 縮重を介して、前記(A)～(E) いずれか記載の核酸とは異なる塩基配列を有する核酸であって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸、
からなる群より選択された核酸の塩基配列を有する遺伝子；
- (2) 前記(1)記載の遺伝子を含有してなる組換えDNA；
- (3) 前記(1)記載の遺伝子または前記(2)記載の組換えDNAを含有し

てなる、微生物、動物細胞又は植物細胞用発現ベクター；

(4) 前記〔3〕記載の発現ベクターを保持してなる形質転換体；

(5) セラミダーゼ遺伝子が発現され、かつ該遺伝子にコードされたポリペプチドの生産に適する条件下に、前記〔4〕記載の形質転換体を培養し、得られた培養物からセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを採取することを特徴とする、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法；

(6) 配列表の配列番号：14に記載のアミノ酸配列又はその一部を有してなるポリペプチドであって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチド；

(7) 前記〔1〕記載の遺伝子によりコードされてなる、セラミダーゼ活性を有するポリペプチド；

(8) 前記〔1〕記載の遺伝子又はその一部に相補的なアンチセンスDNA；

(9) 前記〔1〕記載の遺伝子又はその一部に相補的なアンチセンスRNA；

(10) 前記〔8〕記載のアンチセンスDNAを含有してなる発現ベクター；

(11) 前記〔1〕記載の遺伝子又はその相補鎖に特異的にハイブリダイズし
うるオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマー；

(12) 前記〔6〕又は〔7〕記載のポリペプチドに特異的に結合しうる抗体
又はその断片；

(13) 前記〔11〕記載のオリゴヌクレオチドプローブ及び／又はプライマ
ーを使用する、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の検
出方法；

(14) 前記〔11〕記載のオリゴヌクレオチドプローブ及び／又はプライマ
ーを含有してなる、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子
の検出に用いるためのキット；

(15) 前記〔12〕記載の抗体又はその断片を使用する、セラミダーゼ活性
を有するポリペプチドの検出方法；

(16) 前記〔12〕記載の抗体又はその断片を含有してなるセラミダーゼ活

性を有するポリペプチドの検出に用いるためのキット；並びに

(17) 前記(1)記載の遺伝子又はそのアンチセンス核酸を細胞及び／又は組織に導入し、それにより細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量を調節することを特徴とする、細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量の調節方法に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、セラミダーゼの至適pHを示す図である。

第2図は、セラミダーゼ遺伝子を含むDNA断片の制限酵素地図である。

発明を実施するための最良の形態

中性・アルカリ性セラミダーゼのコンセンサス配列などの情報が明らかではなかったため、本発明者らは、前記中性・アルカリ性セラミダーゼを単離してアミノ酸情報を得、それにより初めて前記セラミダーゼをコードする遺伝子を単離することができた。

これにより、本発明のマウス肝臓由来中性・アルカリ性セラミダーゼのアミノ酸配列は、シュードモナス属細菌〔シュードモナス・エルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*)〕由来の既知のアルカリ性セラミダーゼ〔前出ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第273巻、第14368～14373頁(1998)〕のアミノ酸配列との相同性が低いという驚くべき知見を得ることができた。

本発明のセラミダーゼは、哺乳類由来の中性・アルカリ性セラミダーゼとして初めて明らかにされたものである。従って、本発明は、公知のシュードモナス属細菌由来の既知のアルカリ性セラミダーゼに比べて、生体内におけるセラミドの機能の解明、その代謝の制御、セラミドに関連した疾病の診断、治療等の開発により一層有用である。

以下、本発明を説明する。

(1) セラミダーゼ活性を有するポリペプチド

本明細書において、「セラミダーゼ活性を有するポリペプチド」（本明細書においては、単にセラミダーゼと記載する場合がある）とは、前記のようにセラミドをスフィンゴイドと脂肪酸とに加水分解する活性を有する酵素をいう。また、「中性・アルカリ性セラミダーゼ」とは、酸性領域よりも高いpHに至適pHを有するセラミダーゼをいう。

その一例として、本発明において単離精製されたマウス肝臓由来の中性・アルカリ性セラミダーゼの酵素化学的、理化学的性質を記載する。

1. 作用

本発明のセラミダーゼは、セラミドを加水分解しスフィンゴイドと脂肪酸とを生成する。

なお、当該セラミダーゼの活性は、例えば、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第275巻、第3462～3468頁（2000）に記載の方法に従って測定することができる。すなわち、 $20\mu l$ の 25mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）中に 550pmol の、C12-NBD-セラミド [アナリティカル・バイオケミストリー（Anal. Biochem.）、第263巻、第183～188頁（1998）]、1.0%（W/V）コール酸ナトリウム及び適量の酵素（セラミダーゼ）を溶解した反応混合液を 37°C にて30分間インキュベートする。反応液を沸騰水浴で5分インキュベートすることにより反応を停止する。得られた反応液を更に減圧乾固する。乾固物をクロロホルム/メタノール=2/1（V/V）に溶解し、シリカゲル薄層クロマトグラフィ（展開溶媒：クロロホルム/メタノール/25%アンモニア水=90/20/0.5（V/V/V））で展開する。その後、CS-9300クロマトスキャナー（島津製作所製）を用い励起波長 475nm 、蛍光波長 525nm で、上記の反応により生成したC12-NBD-脂肪酸の定量

を行なう。本酵素（セラミダーゼ）の1ユニット（U）は、上記の条件下で1分間あたり $1\mu\text{モル}$ のC12-NBD-脂肪酸がC12-NBD-セラミドから加水分解されて放出されるのに要する酵素量と定義する。

2. 基質特異性

脂肪酸部分を ^{14}C 放射性同位体で標識した各種スフィンゴ脂質 100 pmol に対し、本発明のセラミダーゼ 5 mU を 1% コール酸ナトリウムを含む 25 mM トリス-塩酸、pH 7.5緩衝液 20 ml 中で 37°C 、24時間作用させる。反応液はシリカゲル薄層クロマトグラフィにより展開後、イメージングアライザーアス1000（富士フィルム社製）により ^{14}C -標識スフィンゴ脂質と、酵素反応によって生じた ^{14}C -標識脂肪酸とを検出定量し、得られた値から分解率を算出する。本発明のセラミダーゼの基質特異性を表1に示す。

本発明のセラミダーゼは、表1に示すように、①種々のN-アシルスフィンゴシンを加水分解する；②ガラクトシルセラミド、スルファチド、GM1a、スフィンゴミエリンには作用しない；③スフィンゲニン（d18:1）を含むセラミドに対して、スフィンガニン（d18:0）を含むセラミドより、よく作用する；④フィトスフィンゴシン（t18:0）を含むセラミドには作用しにくい等の基質特異性を示す。

表 1

基質（構造）	分解率（%）
N-ラウロイルスフィンゴシン (C12:0/d18:1)	63
N-パルミトイ尔斯フィンゴシン (C16:0/d18:1)	93
N-ステアロイルスフィンゴシン (C18:0/d18:1)	83
N-パルミトイ尔斯フィンガニン (C16:0/d18:0)	59
N-ステアロイルスフィンガニン (C18:0/d18:0)	40
N-パルミトイルフィトスフィンゴシン (C16:0/t18:0)	5
N-ステアロイルフィトスフィンゴシン (C18:0/t18:0)	2
NBD-N-ドデカノイルスフィンゴシン (NBD-C12:0/d18:1)	97
NBD-N-ヘキサノイルスフィンゴシン (NBD-C6:0/d18:1)	2
ガラクトシルセラミド (Galb1-1' Cer)	0
スルファチド (HSO3-3Galb1-1' Cer)	0
GM1a (Galb1-3GalNAcb1-4(NeuAca2-3)Galb1-4Glcbl-1' Cer)	0
スフィンゴミエリン (Choline phosphate Cer)	0

3. 至適 pH

3.3-ジメチルグルタル酸、50 mM トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、50 mM 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール) 20 mL 中、100 pmol の C12-NBD-セラミドに対し本発明のセラミダーゼ 16 mU を 37°C、24 時間作用させる。反応液は、シリカゲル薄層クロマトグラフィにより展開する。ついで、CS-9300 クロマトスキャナーを用い、検出波長 525 nm で NBD-標識セラミドと、酵素反応で生じた NBD-標識脂肪酸とを検出定量し、得られた値から分解率を算出する。第1図は、C12-NBD-標識セラミド分解活性と pH の関係を示す図であり、縦軸は分解率（%）、横軸は反応 pH を示す。

。第1図の結果に示すように、本セラミダーゼの至適pHは、7.0～8.0である。

4. 温度安定性

本発明のセラミダーゼは、0.1% ポリドカノール (polidocanol) (商品名: ルブロール (Lubrol) PX) を含む20 mMトリス-塩酸 (pH 7.5) 緩衝液中、37°C、24時間処理した場合には活性の低下は見られないが、60°C、1時間の処理により処理前の活性の約30%に活性が低下する。

5. 分子量

本発明のセラミダーゼの分子量は、SDS-PAGE (還元条件下) により約94 kDa である。またグリコペプチダーゼ Fにより消化された本酵素は、SDS-PAGE (還元条件下) により約73 kDa である。

なお、本明細書において、「セラミダーゼ活性を有するポリペプチド」の一例としては、配列表の配列番号：14に示されたアミノ酸配列を有する、マウス由来の天然型セラミダーゼのポリペプチドが挙げられる。さらに、該アミノ酸配列を有するポリペプチドのみならず、上記のような方法での活性測定により同様のセラミダーゼ活性が認められるものであれば、配列表の配列番号：14に示されるアミノ酸配列中に1個以上のアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入等の変異が導入されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも「セラミダーゼ活性を有するポリペプチド」に包含される。また前記変異は、得られたポリペプチドがセラミダーゼ活性を呈しうる変異であれば、2種以上の変異が導入されていてもよい。なお、本明細書において、「変異が導入されたアミノ酸配列」は、人為的に変異を導入したアミノ酸配列及び天然由来の変異を有するアミノ酸配列のいずれをも包含する。

かかる変異を有するセラミダーゼは、具体的には、例えば、後述のセラミダーゼ遺伝子の塩基配列 (配列番号：15) において、変異を有する変異遺伝子につ

いて、下記ステップ：

(a) 前記遺伝子の発現産物を、反応混合液〔組成：20μl の25mMトリス塩酸緩衝液(pH 6～9、好ましくは6.5～8.5、より好ましくは7～8、特に好ましくは7.5)中、550pmolのC12-NBD-セラミド、及び1.0% (W/V) コール酸ナトリウム〕中、37°Cで30分間インキュベートして反応させるステップ、並びに

(b) 得られた反応物について、C12-NBD-脂肪酸の生成を検出するステップ、

により、セラミダーゼ活性を示すポリペプチドを選択することにより得ることができる。

(2) セラミダーゼ遺伝子

本発明においてセラミダーゼ遺伝子とは、上記の「セラミダーゼ活性を有するポリペプチド」をコードする核酸の塩基配列を有する遺伝子、又は該遺伝子の塩基配列を含む核酸である。その一例としては、配列表の配列番号：14に記載のアミノ酸配列又はその一部からなるポリペプチドをコードする核酸の塩基配列を有する遺伝子、配列表の配列番号：15に記載の塩基配列又はその一部からなる核酸の塩基配列を有する遺伝子が挙げられるが、本発明はこれらに限定されるものではない。このように、配列番号：14に記載のアミノ酸配列の一部からなるポリペプチドをコードする核酸の塩基配列を有する遺伝子又は配列番号：15に記載の塩基配列の一部からなる核酸の塩基配列を有する遺伝子であっても、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードするものであれば、本発明の範囲に包含される。これらの遺伝子は、マウス肝臓由来中性・アルカリ性セラミダーゼの遺伝子であるが、本発明のセラミダーゼ遺伝子の起源は、前記(1)に記載のステップ(a)及び(b)と同様にして遺伝子産物のセラミダーゼ活性を検出されうるものであれば特に限定されない。かかる起源としては、例えば、マウス、

ラット、ヒト、ハムスター、モルモット等が挙げられる。

なお、本明細書において、「(アミノ酸配列の)一部からなるポリペプチド」とは、前記(1)に記載のステップ(a)及び(b)によりセラミダーゼ活性を検出できるものを意味する。

さらに、同様のセラミダーゼ活性を呈しうる、変異を有するセラミダーゼをコードする遺伝子も本発明に包含される。例えば、配列表の配列番号：15に記載のアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換等の変異が導入されたアミノ酸配列をコードする核酸の塩基配列を有する遺伝子であっても、該遺伝子にコードされるポリペプチドがセラミダーゼ活性を有するものであれば、本発明の遺伝子に含まれる。このように変異を有する天然由来の遺伝子のみならず人為的に作製された遺伝子であっても、中性・アルカリ性セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸の塩基配列を有する遺伝子であれば本発明の範囲に包含される。

上記のような、人為的に変異の導入された遺伝子の作製方法としては、例えば以下のような方法が使用される。

ランダムな変異を導入する方法としては、例えば、亜硫酸水素ナトリウムを用いた化学的な処理によりシトシン塩基をウラシル塩基に置換するトランジション変異を起こさせる方法〔プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ・オブ・ザ・U.S.A.、第79巻、第1408～1412頁(1982)〕、マンガンを含む反応液中でPCRを行い、DNA合成時のヌクレオチドの取り込みの正確さを低くする方法〔アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.)、第224、第347～353頁(1995)〕等を用いることができる。

部位特異的変異を導入する方法としては、例えば、アンバー変異を利用する方法〔ギャップド・デュプレックス(gapped duplex)法、ヌクレイック・アシズ・リサーチ(Nucleic Acids Research)、第12巻、第9441～9456頁(1984)〕、d u t (dUTPase)とung(ウラシル-DNAグリコシラーゼ)遺伝子を欠

損した宿主を利用する方法〔クンケル (Kunkel) 法、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ・オブ・ザ・U.S.A.、第82巻、第488～492頁(1985)〕、アンバー変異を利用したPCRによる方法(国際公開第98/02535号パンフレット)等を用いることができる。これらの方法で目的の遺伝子に部位特異的な変異を導入するための各種のキットが市販されており、該キットを利用することにより、所望の変異を導入された遺伝子を容易に取得することが可能である。

また、前記核酸の相補鎖とストリンジエントな条件下にハイブリダイズする核酸であって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸の塩基配列を有する遺伝子も本発明の遺伝子に含まれる。セラミダーゼ活性は、例えば、前記(1)に記載のステップ(a)及び(b)により検出することができる。

ここで、「ストリンジエントな条件」とは、例えば以下の条件をいう。すなわち、0.5% SDS、5×デンハルツ [Denhardt's、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%フィコール400] 及び $100\mu g/ml$ サケ精子DNAを含む6×SSC (1×SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH 7.0) 中で、50°Cで4時間～一晩保温を行う条件をいう。

また、ハイブリダイゼーション操作の詳細は、例えば、1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) 発行、T. マニアティス (T. Maniatis) ら編集、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd ed.) に記載されている。

なお、縮重遺伝子コードを介して、前記核酸とは異なる塩基配列を有する遺伝子も本発明のセラミダーゼ遺伝子に含まれる。

なお、本発明の遺伝子によりコードされたポリペプチドは、前記(1)に記載

のステップ(a)及び(b)により、セラミダーゼ活性が検出されるものであれば、本発明に含まれる。

本発明の遺伝子によれば、さらに種々の使用目的に適した組換えDNAが提供される。ここで、「組換えDNA」とは、遺伝子工学的手法により得られた、本発明の遺伝子を含有したDNAである。

本発明のセラミダーゼ遺伝子を含有した組換えDNAを公知のベクター等に連結し、セラミダーゼ遺伝子が発現可能な状態で挿入された発現ベクターを作製することができる。かかる発現ベクターも本発明に含まれる。

本発明において、発現ベクターとは、前記遺伝子または組換えDNAが挿入され、かつ所望の宿主細胞で発現するように構築されたベクターである。また、後述のアンチセンスDNAを挿入したベクターも本発明の発現ベクターに含まれる。挿入されるベクターとしては、プラスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクター等が挙げられる。プラスミドベクターとしてはpUC18、pUC19、pBluescript、pETなどの市販品が好適に使用でき、ファージベクターとしては、λgt10、λgt11等のラムダファージベクターなどの市販品が好適に使用できるが、これらに限定されるものではない。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等が使用できるが、これらに限定されるものではない。これらのベクターは、用いる宿主細胞に応じて、適宜選ばれる。かかるベクターには、誘導可能なプロモーター、選択用マーカー遺伝子、ターミネーターなどの因子を適宜有していてもよい。

また、使用目的によっては、単離精製が容易になるように、Hisタグ、GST融合タンパク質として発現しうる配列を有するベクターを用いてもよい。この場合、宿主細胞内で機能する適切なプロモーター（例えば、lac、tac、trc、trp、CMV、SV40初期プロモーターなど）を有するGST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）融合タンパク質ベクター（例えば、pGEX

4 T) やタグ（例えば、Myc、His Aなど）配列を有するベクターなどを用いることができる。

(3) セラミダーゼ遺伝子を含有した形質転換体

本発明のセラミダーゼ遺伝子が挿入された発現ベクターで宿主の形質転換を行うことにより、本発明の形質転換体、すなわち本発明のセラミダーゼ遺伝子を発現する細胞を得ることができる。使用する宿主は、所望のセラミダーゼの使用目的により適宜選択することができ、大腸菌をはじめとする微生物、酵母の他、動物細胞、植物細胞、動物個体、植物個体等を用いることができる。具体的には、大腸菌としては、Escherichia coli K-12 系統のHB101 株、C600株、JM109 株、DH5 α 株、DH10B 株、XL-1BlueMRF' 株、TOP10F株などが挙げられる。また、酵母細胞としては、サッカロミセス・セルビジエなどが挙げられる。動物細胞としては、L、3T3、FM3A、CHO、COS、Vero、HeLaなどが挙げられる。植物細胞としては、タバコBY2 などが挙げられる。

発現ベクターを宿主に導入する方法としては、例えば、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリ・マニュアル 第2版、第249-254頁に記載の方法を用いることができる。次に、目的の遺伝子を発現する形質転換体を選択するためには、発現ベクターの特性を利用する。例えばプラスミドベクターが p Bluestrip で、大腸菌を宿主細胞とする場合、アンピシリンを含むプレート上でアンピシリン耐性を有するコロニーを、あるいはアンピシリン、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド (X-Gal) 及びイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を含むプレート上で、アンピシリン耐性を示し、かつ、白色を呈するコロニーを選択することにより外来遺伝子を導入されたコロニーを選別する。

本発明の形質転換体の培養を通常用いられる条件下で行なうことによって、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドを生産させることができる。なお、本発明

の遺伝子を発現させる宿主により、コドン使用頻度が異なり、発現が抑制される場合があるが、この場合、本発明の遺伝子に使用されるコドンを、それぞれの宿主に合わせたコドンにかえて用いてもよい。また、前記発現ベクターは、プラスミド由来のベクターのみに限定されるものではなく、本発明の目的を妨げないものであれば、ファージ、コスミド等由来のベクターを用いてもよい。本発明のポリペプチドを容易にかつ大量に製造する観点から、外来遺伝子を誘導発現させることが可能なベクター、レポーター遺伝子産物との融合蛋白質として発現させることが可能なベクター等が望ましい。

セラミダーゼの発現の確認は、セラミダーゼ活性を測定することにより行なうことができる。活性測定は、例えば、形質転換体の細胞抽出液を試料としてジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第275巻、第3462～3468頁(2000)に記載の方法、例えば、前記(1)に記載のステップ(a)及び(b)と同様の操作により行なうことができる。また、細胞内のセラミド量の測定によっても、セラミダーゼの発現の確認を行なうことができる。上記セラミド量の測定は、例えば、アナリティカルバイオケミストリー(Aalytical Biochemistry)、第244巻、第291～300頁(1997)に記載の方法で行なうことができる。また、セラミダーゼに対する抗体を使用することもできるが、セラミダーゼを他のポリペプチド(本発明のセラミダーゼを除くポリペプチド)との融合体として発現させる場合には、そのポリペプチド(本発明のセラミダーゼを除くポリペプチド)部分に対する抗体を用いてもよい。抗体を使用する場合には、例えば形質転換体の細胞抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、ポリビニリデンフルオライド(PVDF)膜上に転写し、この膜上で抗体を用いて検出することができる。

(4) セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法

本発明は、本発明の遺伝子が発現され、かつ該遺伝子にコードされたポリペプ

チドの生産に適する条件下に、上記の形質転換体を培養し、得られた培養物からセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを採取する、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドを製造方法をも提供する。形質転換体の培養方法には、特に限定はなく、使用された宿主に適した公知の培養方法から適当なものを選択すればよい。

本発明の製造方法において、上記の形質転換体が微生物あるいは培養細胞である場合には、培地組成、培地のpH、培養温度、培養時間の他、インデューサーの使用量、使用時間等についてセラミダーゼの発現に最適な条件を決定することによって、効率よくセラミダーゼを生産させることができる。

形質転換体の培養物からセラミダーゼを精製するには通常の方法が用いられる。形質転換体が大腸菌のように細胞内にセラミダーゼが蓄積する場合には、培養終了後、遠心分離によって形質転換体細胞を集め、得られた細胞を超音波処理などによって破碎した後、遠心分離等によって無細胞抽出液を得る。これを出発材料とし、塩析法の他、イオン交換、ゲル濾過、疎水、アフィニティーなどの各種クロマトグラフィー等の一般的なタンパク質精製法により精製することができる。用いる宿主-ベクター系によっては発現産物が細胞外に分泌される場合があるが、このような場合は培養上清から同様に精製を行なえばよい。

本発明の製造方法によれば、該セラミダーゼが細胞内に生産される場合、目的のセラミダーゼと細胞内の諸酵素、タンパク質などの夾雑物とが共存するが、これらの夾雫物は、発現されるセラミダーゼの量に比べて微量にすぎないため、その精製は極めて容易であるという優れた利点がある。また、ベクターとして細胞外分泌型のベクターを用いた場合、セラミダーゼが細胞外に分泌され、セラミダーゼを含む画分には、培地成分などが共存する。しかしながら、これらは通常セラミダーゼの精製の妨げとなるようなタンパク質成分をほとんど含まないため、例えば、マウス肝臓からのセラミダーゼの精製に必要であった煩雑な分離精製操作を必要としないという優れた利点がある。

また、真核生物由来のセラミダーゼの場合、酵素自身に糖鎖を有している可能性があり、宿主細胞として糖鎖生合成能力を持たない細胞、例えば、大腸菌、枯草菌、放線菌のような原核生物、あるいは酵母、真菌、動物細胞、昆虫細胞及び植物細胞の糖鎖生合成能力を失った変異細胞を用いることによって、糖鎖を持たないセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを製造することができる。更に、糖鎖を有する酵素を生産することも可能であり、この場合は、宿主細胞として、糖鎖生合成能力を有する細胞、例えば、酵母、真菌、動物細胞、昆虫細胞及び植物細胞を用いることによって、糖鎖を持つセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを製造することができる。

また、用いる宿主-ベクター系によっては、発現産物が不溶性の封入体 (inclusion body) として形成されることがある。この場合、培養終了後に遠心分離によって細胞を集め、これを超音波処理などによって破碎した後、遠心分離等を行なうことにより封入体を含む不溶性画分を集める。封入体を洗浄した後、通常用いられるタンパク質可溶化剤、例えば尿素やグアニジン塩酸塩等で可溶化し、必要に応じてこれをイオン交換、ゲルfiltration、疎水、アフィニティーなどの各種クロマトグラフィーを行なうことにより精製した後、透析法あるいは希釈法などを用いたリフォールディング操作を行なうことによってセラミダーゼ活性を保持したポリペプチドを含む標品を得ることができる。必要に応じてこの標品を更に各種クロマトグラフィーによって精製すれば、高純度のセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを得ることができる。

(5) ハイブリダイゼーション用プローブ及びPCR用プライマー

本発明のオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーは、本発明の遺伝子、又はその相補鎖に特異的にハイブリダイズしうる。かかるオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーは、本発明のセラミダーゼ遺伝子の塩基配列をもとに設計し、例えば、常法により化学的に合成することにより作製されうる。該オリゴヌク

レオチドプローブの塩基配列には特に限定はないが、前記セラミダーゼ遺伝子、又は該遺伝子に相補的な塩基配列を有する核酸にストリンジェントな条件下にハイブリダイズするものであればよい。上記「ストリンジェントな条件」とは、特に限定されないが、例えば、 $6 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 、 $5 \times \text{デンハルト}$ 、 $100 \text{mg}/\text{ml}$ ニシン精子DNAを含む溶液中、〔前記プローブのTm - 25°C〕の温度で一晩保温する条件等をいう。また、上記のプライマーの塩基配列にも特に限定はなく、通常のPCRの反応条件において前記セラミダーゼ遺伝子、又は該遺伝子に相補的な塩基配列を有する遺伝子にアニーリングし、DNAポリメラーゼによる伸長反応を開始できるものであればよい。

オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーのTmは、例えば、下記式：

$$T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41 (\%G+C) - (600/N)$$

(式中、Nはオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーの鎖長であり、%G+Cはオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマー中のグアニン及びシトシン残基の含有量である)

により求められる。

また、オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーの鎖長が18塩基より短い場合、Tmは、例えば、A+T(アデニン+チミン)残基の含有量と2°Cとの積と、G+C残基の含有量と4°Cとの積との和 $[(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4]$ により推定することができる。

上記のオリゴヌクレオチドプローブの鎖長としては、特に限定はないが、非特異的なハイブリダイゼーションを防止する観点から、15塩基以上であることが好ましく、18塩基以上であることがさらに好ましい。

また、本発明のプライマーにおいても、前記オリゴヌクレオチドプローブと同様の塩基配列を有する核酸が挙げられる。例えば、本発明の遺伝子の塩基配列をもとに設計し、化学的に合成すること等により作製することができる。プライマーの鎖長には、特に限定はないが、例えば、15～40塩基の鎖長のものを使用

することができ、特に17～30塩基の鎖長のものを好適に使用することができる。前記プライマーはPCR法をはじめとする種々の遺伝子増幅法に使用することが可能であり、これによって、本発明のセラミダーゼ遺伝子の検出を行うことができる。

また、前記オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーとして、天然由来のセラミダーゼをコードする核酸を、制限酵素処理、エキソ型ヌクレアーゼ処理等の酵素的処理、超音波等の物理的処理等により断片化し、得られた断片を、アガロースゲル等に代表される各種核酸分離法により分離精製することにより得られた核酸を用いてもよい。前記のようにして得られた核酸は、セラミダーゼに特徴的な配列を有する領域由来であることが望ましい。

さらに、前記オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーは、検出対象の核酸をより容易に検出をおこなうために、公知の方法にしたがって適当な標識を施し、本発明のセラミダーゼ遺伝子の検出に使用することができる。標識には、特に限定するものではないが、放射性同位元素の他、蛍光物質、ビオチンやジゴキシゲニンのようなリガンドなどに代表される各種の標識をおこなってもよい。

本発明のハイブリダイゼーション用のプローブを用いて、マウス肝臓以外の臓器あるいはマウス以外の生物体由来のゲノムDNAもしくはcDNA、又はゲノムDNAライブラリーもしくはcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のセラミダーゼ遺伝子と相同性の高いDNAをクローニングすることができる。

また、本発明のプライマーを用いて、マウス肝臓以外の臓器あるいはマウス以外の生物体由来のゲノムDNAもしくはcDNA、又はゲノムDNAライブラリーもしくはcDNAライブラリーから、PCR法により本発明のセラミダーゼ遺伝子と相同性の高いDNA断片を検出したり、さらにはその全長の遺伝子を得ることもできる。

(6) 遺伝子の検出方法

本発明の遺伝子の検出方法は、前記オリゴヌクレオチドプローブ及び／又はプライマーを使用し検出用試料中の遺伝子を検出することを1つの大きな特徴とする。

本発明の検出方法においては、前記オリゴヌクレオチドプローブを用いてハイブリダイゼーション法などにより遺伝子の検出を行なってもよく、また、前記プライマーを用いて、PCR法などのDNA増幅方法により遺伝子の検出を行なってもよい。

オリゴヌクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼーションの場合、検出用試料としては、例えば、微生物のコロニーや培養細胞、組織切片のような試料、これらの試料中のDNAやRNAを膜上に固定したもの、これらの試料から抽出されたDNAやRNAなどが挙げられる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版等に記載の公知の方法にしたがって行なうことができる。当該ハイブリダイゼーションの条件は、用いるプローブのTm値、標的DNAのGC含量などにより適宜決定することができる。例えば、前記モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版に記載の条件などを適用できる。

プライマーを用いて遺伝子の検出を行う場合、検出用試料としては、例えば、微生物培養液、微生物コロニー、微生物菌体のような微生物試料、培養細胞、組織、組織切片のような生体由来試料などが挙げられる。これらの試料は、例えば、単離した微生物や培養細胞をそのままの状態で用いてもよく、適切な処置を施した状態で用いてもよい。また組織のような固体試料は浸出液や懸濁液を調製して使用することができる。また、これらの試料の上清又はこれらの試料について界面活性剤処理のような細胞溶解処理が施された試料やその上清も使用することができます。さらに、検出対象である核酸を損なわない範囲で試料中の他の成分を

除去する操作が施されていてもよい。

前記プライマーを用いてPCR法により検出を行なう場合、PCR条件は、用いるプライマーのT_m値、増幅し検出する対象の領域の長さなどにより、適宜選択することができる。PCR法では、増幅産物の有無を確認することにより目的の遺伝子を検出することができる。増幅の有無の確認法には特に限定はないが、例えば核酸増幅反応液をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを適当な核酸染色試薬、例えばエチジウムプロマイド、サイバー・グリーンⅠ(SYBER Green I)等で染色し、紫外線を照射して生じるバンドの有無を検出することにより確認できる。バンドの検出は肉眼で観察してもよいが、例えば蛍光イメージアナライザ等を用いて検出することもできる。

本発明の遺伝子の検出方法においては、検出感度を上昇させるために、前記プローブ及びプライマーを併用してもよい。例えば、前記プライマーを用いて、PCR法により、試料中に微量に存在するセラミダーゼ遺伝子を増幅し、ついで、プローブを用いて該遺伝子とハイブリダイズさせることによって、高感度かつ正確に検出することができる。

本発明の検出方法によりセラミダーゼ遺伝子の検出を行ない、さらに該遺伝子の量を決定する場合には、ハイブリダイズしたプローブに由来するシグナルの強度、プライマーを用いて増幅された産物に由来するバンドの蛍光強度などを定量することにより行なうことができる。mRNAを測定対象としてその定量を行うことにより、目的遺伝子の発現量を調べることができる。

また、本発明の検出方法には、本発明の遺伝子の検出に用いるためのキットを使用することにより、より簡便に検出を行なうことができる。かかるキットも本発明に含まれる。前記キットは、上記のオリゴヌクレオチドプローブ及び／又は上記のプライマーを含有してなることを1つの特徴とする。前記キットは、検出操作に使用される種々のコンポーネントを含んでもよく、例えば、オリゴヌクレオチドプローブを含むキットの場合には核酸を固定するための膜やハイブリダイ

ゼーション緩衝液などに代表されるハイブリダイゼーション用の各種試薬、また、プライマーを含むキットの場合には耐熱性DNAポリメラーゼ、dNTP混合液、PCR用緩衝液などに代表されるPCR用試薬を含んでいてもよい。さらに、プローブや増幅されたDNAを検出するための試薬や微生物増殖用の培地、細胞培養用の培地、試料より核酸を抽出するための試薬などを含有してもよい。

(7) セラミダーゼ活性を有するポリペプチドに特異的に結合する抗体又はその断片

本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体又はその断片は、該ポリペプチドに特異的に結合する能力を有するものであれば、特に限定はなく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のどちらでもよい。さらに、公知技術により修飾された抗体や抗体の誘導体、例えばヒト化抗体、Fabフラグメント、単鎖抗体等を使用することもできる。本発明の抗体は、例えば、1992年、ジョン・ワイリー&サンズ社 (John Wiley & Sons, Inc) 発行、ジョン・E・コリガン (John E. Coligan) 編集、カレント・プロトコルズ・イン・イムノロジー (Current Protocols in Immunology) に記載の方法により、本発明のポリペプチドの全部又は一部を用いてウサギやラット、マウス等を免疫することにより、容易に作製され得る。こうして得られた抗体を精製後、ペプチダーゼ等により処理することにより、抗体の断片が得られる。また、遺伝子工学的に抗体を作製することもできる。さらに、本発明の抗体又はその断片は、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法などによる検出を容易にするために、各種修飾をしてよい。

上記の抗体又はその断片には、ポリペプチドのある部分断片に特異的に結合し得るものも含まれる。

得られた抗体又はその断片の用途としては、セラミダーゼ生産菌の検出、セラミダーゼ発現細胞株の検出、培養細胞や組織中のセラミダーゼタンパク質の検出、アフィニティクロマトグラフィー、各種ライプラリー (ゲノムDNA又はc

DNA) の発現産物のスクリーニング、医薬、診断薬、研究用試薬等への応用が考えられる。

(8) ポリペプチドの検出方法

本発明のポリペプチドの検出方法は、前記抗体又はその断片を使用し、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドを検出することを特徴とする。

本発明においては、検出用試料として、例えば、微生物や動物細胞の培養物、組織切片、微生物や動物細胞の細胞破碎物、皮膚等の組織の抽出液あるいは洗浄液、微生物や動物細胞、組織由来のタンパク質が固定された膜などのタンパク質試料を用いることができる。

抗体又はその断片の前記ポリペプチドへの特異的な結合の検出は、公知の方法が利用できるが、例えば、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法などが挙げられる。

本発明のポリペプチドの検出方法には、本発明のポリペプチドの検出に用いるためのキットを使用することにより、より簡便に検出を行なうことができる。かかるキットも本発明に含まれる。前記キットは、上記の抗体又はその断片を含有してなることを特徴とする。また、該キットは反応用緩衝液、標識二次抗体、発色試薬などを含有してもよい。

(9) アンチセンスDNA及びアンチセンスRNA

本発明において、「アンチセンスDNA」及び「アンチセンスRNA」とは、本発明のセラミダーゼ遺伝子又はその一部と相補的な塩基配列を有し、内因性のセラミダーゼ遺伝子（ゲノムDNA及びmRNA）と2本鎖を形成することによって、該遺伝子からの遺伝子情報の発現（転写、翻訳）を抑制又は制御するものをいう。アンチセンスDNA又はアンチセンスRNAの長さは、塩基配列の特異性や細胞内に導入する方法に応じて変えることが可能である。アンチセンスDN

A又はアンチセンスRNAは、合成機を用いて人工的に合成したり、本発明の遺伝子を鋳型とした酵素反応によって通常と逆の向き（アンチセンスの向き）に遺伝子を発現させること等により、作製することが可能である。生体内においてアンチセンスRNAの発現が望まれる場合には、本発明の遺伝子を通常とは逆の向きに接続した発現ベクターを構築し、これを生体内に導入すればよい。

例えば、t a t 遺伝子 [ヌクレオトッド アシドズ リサーチ (Nucleic Acids Research)、第19巻、第3359～3368頁 (1991)]、あるいはr e v 遺伝子 [プロセッシングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシーズ オブ ザ USA (Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA)、第86巻、第4244～4248頁 (1989)] を利用したH I Vの増殖抑制等、アンチセンス技術は数多く知られており、従って、これらのことにより、本発明のアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAを用いて、内因性のセラミダーゼ遺伝子の発現を抑制又は制御することが可能である。また、本発明のアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAは、in situ ハイブリダイゼーション等の研究試薬として利用可能である。

(10) セラミダーゼ遺伝子又はそのアンチセンス核酸を用いた細胞内又は組織内におけるセラミド量の調節

本発明の遺伝子により、さらに細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量の調節方法を提供することができる。かかる調節方法も本発明に包含される。本発明の細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量の調節方法は、本発明のセラミダーゼ遺伝子を細胞及び／又は組織に導入し、それにより細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量を調節することに1つの特徴がある。

即ち、本発明の調節方法においては、本発明のセラミダーゼ遺伝子を細胞又は組織中に導入し、該遺伝子により発現されたセラミダーゼにより、細胞又は組織中のセラミドが分解され、一方、本発明のセラミダーゼ遺伝子を、該遺伝子のア

ンチセンス核酸、例えば、アンチセンスRNAが生成するような形で細胞、組織に導入することにより、当該細胞、組織中のセラミダーゼ活性を低減し、セラミドの分解を抑制することができる。また、セラミド量を抑制する場合には、本発明のセラミダーゼ遺伝子のアンチセンス核酸、即ち、本発明のアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAをそのままの形態で細胞又は組織に導入してもよい。

前記セラミダーゼ遺伝子又はそのアンチセンス核酸を細胞又は組織に導入する方法としては、公知の方法が使用でき、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法等の物理的遺伝子導入方法や、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法を利用することができる。本発明の方法に使用できるウイルスベクターに特に限定はないが、例えばレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等を用いて導入することができる。

本発明の調節方法によれば、本発明のセラミダーゼ遺伝子又はそのアンチセンス核酸を細胞及び／又は組織に導入して、細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量を調節することにより、セラミド量の異常に起因する疾患の治療を行なうことができ、またセラミド代謝異常の疾病モデル動物を作製することができるという優れた効果を奏する。「セラミド量の異常に起因する疾患」としては、特に限定されないが、例えば、ファーバー病等が挙げられる。

以下に、マウス肝臓由来セラミダーゼの遺伝子を取得する方法について説明する。

1) まず、マウス肝臓のホモジネートより膜画分を調製し、これをショ糖-EDTA液に懸濁して凍結融解した後、遠心分離を行って上清（粗酵素抽出液）を得る。この粗酵素抽出液より公知のタンパク質精製方法、例えば各種のクロマトグラフィーを組み合わせて単一な状態に精製されたセラミダーゼ標品を得ることがで

きる。上記の精製に使用できるクロマトグラフィーとしては、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、キレーティングクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等を使用することができる。

2) 次にセラミダーゼ遺伝子をクローニングするためのプローブを作製するための情報として、セラミダーゼの部分アミノ酸配列を調べる。上記の精製セラミダーゼ標品をそのままエドマン分解法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第256巻、第7990~7997頁(1981)] によるアミノ酸配列分析に供することにより、セラミダーゼのN末端アミノ酸配列を知ることができる。また、精製酵素標品を基質特異性の高いプロテアーゼ、例えばリジルエンドペプチダーゼやN-トシリル-L-フェニルアラニルクロロメチルケトン(TPCK)-トリプシン等で消化して得られるペプチド混合物より適当なペプチド断片を精製し、該断片についてアミノ酸配列分析を行うことにより、セラミダーゼ内部の部分アミノ酸配列を得ることができる。

3) こうして明らかとなったアミノ酸配列の情報をもとに、ハイブリダイゼーション用のプローブ、又はPCR用のプライマーとして使用するためのオリゴヌクレオチドを設計し、本発明のセラミダーゼ遺伝子をクローニングする。そのためには、一般的に用いられるPCR又はハイブリダイゼーション法を利用する。PCR法は、1989年、ストックトン・プレス(Stockton Press)社発行、エルリッヒ H. A. (Erlich, H.A.) 編集、PCRテクノロジー(PCR Technology)に記載の方法に準じて行うことができる。ハイブリダイゼーション法は、例えばモレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版に記載の方法に準じて行うことができる。

4) 上記のハイブリダイゼーション又はPCRによって得られたDNA断片は、その塩基配列を解読することにより、そこにコードされうるアミノ酸配列を知ることができる。該配列を、上記2)で得られたセラミダーゼの部分アミノ酸配列と比較し、上記のDNA断片がセラミダーゼ遺伝子の断片であるかどうかを確

認することができる。

5) 3) のハイブリダイゼーション又はPCRによって得られたDNA断片がセラミダーゼ遺伝子の一部であった場合、3) の操作を繰り返すか、あるいは3) で得られたDNA断片の塩基配列をもとに新たなプローブ、プライマーを作製し、これを使用してハイブリダイゼーション又はPCRを実施することにより、セラミダーゼ全長をコードする遺伝子を含むDNA断片を得ることができる。

6) こうして得られたセラミダーゼ全長をコードする遺伝子を適當なベクターに接続して発現ベクターを構築し、該発現ベクターが導入された形質転換体を作製する。この形質転換体を培養して、培養物中のセラミダーゼ活性を調べることにより、得られた遺伝子がセラミダーゼをコードするものであることを確認することができる。

しかしながら、本発明のセラミダーゼ遺伝子のクローニングにおいて、本発明において得られた部分アミノ酸配列情報ではハイブリダイゼーション法によるライプラリーのスクリーニングに適したプローブDNAを設計することはできなかった。また、部分アミノ酸配列及びライプラリー作製に使用したベクターの塩基配列それぞれから様々なPCRプライマーを設計し、各種組み合わせでPCRを行なったが特異的な増幅は見られず、唯一、部分アミノ酸配列C-53（配列表の配列番号：3にC-53のアミノ酸配列を示す）をもとに設計した2種のプライマー同士の組み合わせのみに増幅が見られた。ただし増幅されたDNA断片P-1（配列表の配列番号：6にP-1の塩基配列を示す）は68 bpと短いものであり、そのままハイブリダイゼーション法によるライプラリーのスクリーニング用プローブとして用いることはできなかった。そこでP-1の配列からさらにPCRプライマーを設計するとともに、これをライプラリー作製に使用されたベクターの塩基配列から設計されたプライマーと組み合わせてPCRを行うことにより、初めてハイブリダイゼーション法によるライプラリーのスクリーニング用のプローブに適していると考えられる335 bpの遺伝子断片を得ることに初めて

成功した。

さらに、前記 335 bp の DNA 断片をプローブにして、マウス肝臓由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、セラミダーゼ全長をコードする遺伝子をクローニングすることができる。また、マウス肝臓由来のゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のセラミダーゼのゲノム DNA を得ることも可能である。

以上のようにして得られる、マウス肝臓の產生するセラミダーゼ遺伝子の全塩基配列は、配列表の配列番号：12 に記載されており、ここにコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、配列表の配列番号：13 に記載されている。なお、このアミノ酸配列と当該酵素の N 末端アミノ酸配列より、生体内において当該酵素は N 末端部分のペプチドが除去された成熟型酵素にプロセッシングされたことが判明した。この成熟型セラミダーゼのアミノ酸配列、並びに該配列をコードする塩基配列を、それぞれ配列表の配列番号：14 及び 15 に示す。上記のアミノ酸配列、塩基配列は、それぞれ公知の哺乳類由来セラミダーゼのアミノ酸配列、塩基配列のそれぞれとの間にはホモロジーはない。すなわち、本発明により提供されるセラミダーゼ遺伝子は公知のセラミダーゼ遺伝子とは関係のない、全く新しい配列からなるものである。

このように、本発明により、マウス肝臓由来のセラミダーゼの一次構造及び遺伝子構造が提供される。更に、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの安価で高純度な遺伝子工学的な製造方法が可能となる。

また、本発明のセラミダーゼ遺伝子に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーは、本発明のセラミダーゼ遺伝子の検索、検出や増幅等に有用である。本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体又はその断片は、セラミダーゼの検出、同定や精製等において有用である。

また、本発明の細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量の調節方法によれば、本発明のセラミダーゼ遺伝子又はそのアンチセンス核酸を細胞及び／又は組

織に導入して、細胞及び／又は組織内のセラミド量を調節することができるため、かかる調節方法は、セラミド量の異常に起因する疾患、特に限定されないが、例えば、ファーバー病等の疾患の治療に有用である。

以下に実施例をもってさらに詳細に本発明を説明するが、本発明は実施例の範囲に限定されるものではない。

実施例 1 セラミダーゼの精製

105匹のSea/ddYマウス（成和実験動物研究所製）から摘出した肝臓181gを1mM EDTAを含む0.25Mショ糖液（ショ糖-EDTA液）300ml中でホモジナイズした。このホモジネートを600×gで10分間遠心分離した後、上清を回収した。得られた上清を、さらに2700×gで30分間遠心分離し、沈殿を回収した。

沈殿画分を480mlのショ糖-EDTA液に懸濁して懸濁液を得た。得られた懸濁液を-80°Cで凍結した後、流水下で融解した。この凍結、融解処理を2回繰り返した。ついで、処理懸濁液を105000×gで90分間遠心分離し、上清及び沈殿それぞれを回収した。沈殿は、上記同様の凍結、融解～遠心分離の処理に供した。上清を回収して先の上清と合わせ、520mlの粗酵素抽出液を得た。

粗抽出液260mlを20mMリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化した100mlのDEAE-セファロースFF(アマシャム・ファルマシア社製)カラムにアプライし、非吸着物質を洗浄除去した。ついで、1M NaClを含む同緩衝液による溶出を行い、セラミダーゼ活性画分160mlを回収した。該画分は、続いて1M NaClを含む20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)で平衡化した100mlのフェニル-セファロースFF(アマシャム・ファルマシア社製)カラムにアプライした後、2Mから0MへのNaClの濃度グラジェ

ントで溶出し、更に0%から1%へのポリドカノール(Polidocanol)(商品名:ルブロールPX、ナカライトスク社製)の濃度グラジエントで溶出した。このクロマトグラフィーにより、310mlのセラミダーゼ活性画分を回収した。

得られた活性画分を、0.5M NaCl及び0.1%のルブロールPXを含む20mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)で平衡化した25mlのキレーティング-セファロースFF(アマシャム・ファルマシア社製、Cu²⁺結合型)カラムにアプライした。カラムを同緩衝液及び0.1%のルブロールPXを含む20mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)で洗浄した後、2M NH₄Cl、0.1%のルブロールPXを含む20mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)で酵素の溶出を行なった。溶出された活性画分を限外ろ過により濃縮して濃縮物を得た。ついで、濃縮物中の緩衝液を0.1%のルブロールPXを含む20mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)に置換し、酵素液を得た。得られた酵素液30mlは、更に0.1%のルブロールPXを含む20mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)で平衡化したポロスHQカラム(Φ4.6×100mm、ペーセプティブ・バイオシステムズ社製)にアプライした。ついで、0Mから0.5MへのNaClの濃度グラジエントで溶出し、活性画分を得た。この活性画分を0.2M NaCl、0.1%のルブロールPXを含む1mM リン酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化したハイドロキシアバタイトカラム(Φ7.5×100mm、ペンタックス社製)にアプライした。セラミダーゼは、本カラムに吸着せず通過画分に回収された。ついで、該画分を、0.2M NaCl、0.3%のルブロールPXを含む20mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)で平衡化したスーパーロース200HRカラム(Φ10×300mm、アマシャム・ファルマシア社製)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーに供し、精製セラミダーゼを得た。以上の精製操作の結果、58mgの精製セラミダーゼ標品を得た。

なお、得られた精製セラミダーゼ標品の種々の性質について、本明細書に記載のように検討したところ、下記の通りであった。

作用：セラミドを加水分解しスフィンゴイドと脂肪酸とを生成した。

基質特異性：前記表1に示すとおりの基質特異性を有した。

至適pH：第1図の結果に示すように、本セラミダーゼの至適pHは、7.0～8.0であった。

温度安定性：0.1% ポリドカノール (Polidocanol) (商品名：ルブロール (Lubrol) PX) を含む20mMトリスー塩酸 (pH 7.5) 緩衝液中、37°C、24時間処理した場合には活性の低下は見られないが、60°C、1時間の処理により処理前の活性の約30%に活性が低下した。

分子量：SDS-PAGE (還元条件下) により約94kDaであった。またグリコペプチダーゼ Fにより消化された本酵素は、SDS-PAGE (還元条件下) により約73kDaであった。

実施例2 セラミダーゼの部分アミノ酸配列分析

50 pmolのセラミダーゼを含有する試料液11mLに、0.3%のルブロールPXを含む20mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5) を加えた。得られた試料液を、MonoQ PC1 6/5カラム (100μl、アマシャム・ファルマシア社製) にアプライした。続いて0.4M NaClを含む同緩衝液でカラムに吸着したセラミダーゼ画分を溶出した。この操作により、セラミダーゼを含む画分は、50μlに濃縮された。得られた濃縮液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、泳動後のゲルをゲルコード・ブルー・ステイン・リエージェント (GelCode Blue Stain reagent、ピアス社製) で染色した。ついで、セラミダーゼのバンドを切り出した。切り出されたゲル断片の1/4を0.1% SDSを含む300μlの0.1M トリスー塩酸緩衝液 (pH 9.0) で37°C、16時間抽出した。得られた抽出液を試料として、G1005Aプロテインシーカンシングシステム (ヒューレット・パッカード社製) を用いて、セラミダーゼのN末端アミノ酸配列解析を行い、アミノ酸配列N-terminalを決定した

。配列表の配列番号：1にN-termのアミノ酸配列を示す。

また、切り出されたゲル断片の残り3/4を、1mlの0.5Mトリス-塩酸緩衝液(pH 9.2)/50%アセトニトリル中で30°C、45分洗浄した。窒素ガス及び遠心濃縮機を使用してゲルを完全に乾燥させた後、0.5μgのプロテアーゼLyS-C(和光純薬社製)を含む10μlの0.5Mトリス-塩酸緩衝液(pH 9.2)を加え、更にゲルが完全に膨潤するまで0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH 9.2)を加えて37°Cで16時間保温し、セラミダーゼのプロテアーゼ消化を行なった。反応終了後、150μlの0.1%トリフルオロ酢酸/60%アセトニトリルを用いて、室温で1時間抽出する操作を2回行なって、抽出液を回収した。この抽出液を逆相クロマトグラフィーに供し、ペプチド断片の精製を行なった。得られたペプチド断片をG1005Aプロテインシーケンシングシステムを用いたエドマン分解法により分析し、部分アミノ酸配列C-46、C-53を決定した。配列表の配列番号：2、3にそれぞれC-46、C-53のアミノ酸配列を示す。

実施例3 セラミダーゼ遺伝子を含むDNA断片のPCR法による增幅

実施例2で決定したセラミダーゼの部分アミノ酸配列C-53をもとに、センスミックスプライマー53-S1、アンチセンスミックスプライマー53-A3をデザインし、DNA合成機で合成した。配列表の配列番号：4、5にそれぞれプライマー53-S1、53-A3の塩基配列を示す。これらのプライマーを用いてPCRを行なった。PCRは、マウス肝臓cDNAプラスミドライブラー(宝酒造社製)を鋳型として行なった。PCRは、94°C、9分の後、94°C、0.5分～51°C、0.5分～72°C、1分を1サイクルとする40サイクルを行い、さらに72°C、7分保温することにより行なった。このPCRにより、約70bpの特異的な増幅DNA断片がアガロース電気泳動で検出された。

この増幅DNAをゲルより回収し、これをpGEM-T easyベクター(

プロメガ社製)に組み込み、組換えプラスミドを構築した。該プラスミドの挿入DNA断片の塩基配列解析を行なった結果、この断片の部分塩基配列P-1が決定された。配列表の配列番号：6にP-1の塩基配列を示す。該配列は実施例2で決定されたセラミダーゼの部分アミノ酸配列C-53に対応する配列であり、目的とするセラミダーゼの遺伝子の一部が取得できたことが確認された。

このP-1の塩基配列をもとに、アンチセンスプライマーMA1及びMA2をデザインして合成した。配列表の配列番号：7、8にそれぞれプライマーMA1、MA2の塩基配列を示す。また、マウス肝臓cDNAプラスミドライブラーの構築に用いられたベクターpAP3neoの塩基配列をもとにセンスプライマー-T7in及びT7outをデザインし合成した。配列表の配列番号：9、10にそれぞれプライマー-T7in、T7outの塩基配列を示す。これらのプライマーを用いて、マウス肝臓cDNAライブラーを鋳型としたネスティッドPCRを行なった。1st PCRとして、まずセンスプライマーT7out及びアンチセンスプライマーMA2を使用して94°C、9分の後、94°C、0.5分～51°C、0.5分～72°C、2分を1サイクルとする40サイクルの反応を行ない、さらに72°C、7分間保温した。さらに2nd PCRは、1st PCRの反応液を鋳型とし、センスプライマーT7in及びアンチセンスプライマーMA1を使用する以外は1st PCRと同じ条件で行なった。この結果、335bpの増幅DNA断片が得られた。これを以下に示すコロニーハイブリダイゼーションのプローブとした。

実施例4 セラミダーゼ遺伝子のクローニング

マウス肝臓cDNAプラスミドライブラーを導入された形質転換体を、100μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地プレート上のナイロンフィルター(商品名：ハイボンド-N⁺、アマシャムファルマシア社製)に播種し、9.5×13.5cmのプレート1枚当たり約3万個のコロニーを形成させてマスター

ーフィルターを作製した。このフィルターのレプリカを作製し、得られたレプリカフィルターを10% SDS溶液に浸したる紙上で5分間；0.5M NaOH、1.5M NaCl溶液に浸したる紙上で5分間（変性）；3M NaClを含む0.5M トリスー塩酸緩衝液（pH 7.5）に浸したる紙上で5分間（中和）；2×SSC溶液に浸したる紙上で5分間、それぞれ処理した。ついで、2×SSC溶液でフィルターをリーンスした。このフィルターを風乾したのち、紫外線照射によりDNAをフィルターに固定し、コロニーハイブリダイゼーション用のフィルターとした。

ハイブリダイゼーションのプローブとしては、実施例3で得た増幅DNA断片0.1 μg相当をDNAラベリングキット、レディー・トゥー・ゴー（Ready To Go、ファルマシア社製）を用いて、同キットのプロトコールに従って³²Pで標識したものを用いた。上記のフィルターをハイブリバッグに入れ、ハイブリダイゼーション溶液（組成：7% PEG 6000、10% SDS溶液）中、60°Cで1時間プレハイブリダイゼーションを行なった後、上記の標識プローブを0.006 pmol/m1となるように加え、60°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行なった。次に、60°Cに加温しておいた洗浄液（2×SSC、0.1% SDS）中、60°Cで15分間ずつ3回、フィルターを洗浄した。フィルターから余分な水分を除いた後、富士フィルム社製イメージングプレートに20分間感光した後、BAS 1000イメージングアナライザー（富士フィルム社製）にてシグナルを検出した。次いで本操作により得られた陽性シグナルに対応するマスター フィルター上のコロニーを採取した（1次スクリーニング）。

採集したコロニーを、100 μg/m1のアンピシリンを含むLB培地に懸濁した後100 μg/m1のアンピシリンを含む9.5×13.5 cm LB寒天培地プレート上のナイロンフィルターに播種し、1枚当たり200～1000個のコロニーを形成させてマスター フィルターを作製した。このフィルターについて、1次スクリーニングと同様の方法により陽性クローンのスクリーニングを行

い、さらに同様の操作で3次スクリーニングを実施した。3次スクリーニングの結果、セラミダーゼ遺伝子を含むと考えられる陽性クローンを単離することができた。

この陽性クローンからプラスミドを調製し、これをプラスミドpLCDaseと命名した。該プラスミドを種々の制限酵素、もしくは複数の制限酵素の組み合わせで消化したうえ、生成した各DNA断片をサブクローニングしてその塩基配列を解析した。これにより、プラスミドpLCDaseに挿入されたDNA断片の全塩基配列を決定した。該配列を配列表の配列番号：11に示す。また、該配列中に見出されたオープン・リーディング・フレーム(ORF)の塩基配列、並びにそこにコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を、それぞれ配列表の配列番号：12及び13に示す。さらに、上記のDNA断片の制限酵素地図と、該DNA断片に含有されるオープン・リーディング・フレームの位置を第2図に示す。

上記のORFの塩基配列を解析したところ、ここには実施例2で明らかにされたセラミダーゼの部分アミノ酸配列をコードする塩基配列が含まれており、このORFがセラミダーゼをコードするものであることが確認された。また、該ORFにコードされるセラミダーゼのアミノ酸配列と、配列表の配列番号：1に示されるセラミダーゼのアミノ酸配列とを比較すると、マウス肝臓より精製されたセラミダーゼは、上記のORFにコードされるポリペプチドのうちのN末端部分のペプチドを欠くことが示された。すなわち、セラミダーゼは、翻訳後にそのN末端部分を除去するプロセッシングを受けて成熟型酵素に変換されることが示された。配列表の配列番号：14に成熟型セラミダーゼのアミノ酸配列を、また、配列表の配列番号：15に成熟型セラミダーゼをコードする塩基配列をそれぞれ示す。

実施例5 セラミダーゼ遺伝子の発現

直径3.5mmのディッシュに10%FCS含有α-MEM培地で培養されたCHO細胞（ 3×10^5 細胞/ディッシュ）に、実施例4で得られたプラスミドpLCDase 1μgと、リポフェクトアミン（ライフ・テクノロジーズ社製）5μlとを加えることにより、セラミダーゼ遺伝子をCHO細胞に導入した。この細胞を37°Cで24時間培養後、0.1% Triton X-100を含む100μlの10mM Tris塩酸（pH 7.5）に懸濁し、細胞を破碎した。得られた細胞破碎液について、上記のC12-NBD-セラミドを基質とするセラミダーゼ活性測定を行なったところ、この細胞においてセラミダーゼがpLCDaseを導入していないコントロール細胞に比べて、約1000倍強く発現されていることが確認された。

更に、アナリティカル バイオケミストリー(Aalytical Biochemistry) 第244巻、第291～300頁(1997)に記載の方法に従って、細胞内のセラミド量を測定したところ、pLCDaseを導入した細胞では、導入していないコントロール細胞に比べて、セラミド量が有意に減少していることが確認された。

実施例6 マウス脳からのセラミダーゼ遺伝子のクローニング

アンピシリン100μg/mlを含むLB寒天培地プレートにニトロセルロース膜(Schleicher&Schuell社、PROTRAN BA85 0.45mmを直径8.2mmで使用)をのせ、そのプレート1枚当たり約20万コロニーになるように10枚のプレートにマウス脳cDNAライブラリー(LIFE TECHNOLOGIES社・SUPERSCRIPT Mouse Brain cDNA Library)を播種し、37°Cで10時間培養した。ニトロセルロースメンブレン上に生えた大腸菌をナイロン膜(PALL Gelman Laboratory社・バイオダイルA 直径8.2mm(1.2mm)]に写し取り、それぞれアンピシリンプレートにのせた後、37°Cで3時間培養した。ニトロセルロースメンブレンは、マスターフィルターとして4°Cで保存し、ナイロン膜はクロラムフェニコール・プレートにのせ37°Cで16時間培養した。ナイロン膜から新しいナイロン膜にコロ

ニーを写し取り、各組のナイロンを重ねたまま 1 m l の変性液 (0. 5 M Na OH / 1. 5 M NaCl) で、表と裏それぞれ 5 分間処理した。同様に 1 m l の中和液 (0. 5 M Tris-HCl (pH 7. 4) / 1. 5 M NaCl) で 5 分間処理した。ナイロン膜を離し、風乾後 80°C で 2 時間ベーキングした。その後、200 m l の予洗液 (5 × SSC / 0. 5% SDS / 1 m l EDTA (pH 8. 0)) で 10 分間振とうし、大腸菌被碎片をふき取り、2 × SSC で洗浄した。40 m l のハイブリダーゼーション液 (0. 5 M チャーチリン酸 / 7% SDS / 1 mM EDTA) で、65°C で 2 時間プレハイブリダイゼーションを行なった後、変性後のプローブを含む 40 m l のハイブリダイゼーション液中で、65°C で 16 時間ハイブリダイゼーションを行なった。プローブとして、マウスセラミダーゼ遺伝子を含むプラスミド pAPLCD の EcoRI-EcoRI 断片 2. 7 kbp を使用した。ハイブリダイゼーション終了後 100 m l の洗浄液 (40 mM チャーチリン酸 / 1% SDS) で 65°C、15 分間の洗浄を 2 回行なった。さらに 100 m l の High stringent 洗浄液 (0. 2 × SSC / 0. 1% SDS) で 65°C、15 分間洗浄した。膜を風乾後、1 時間 IP-plate に暴露し、BAS 1500 で解析を行なった。ポジティブ部分のニトロセルロースメンブレンを直径約 6 mm に切りだし、1 m l の LB 培地に懸濁後、4000 倍に希釈したサンプル 200 m l をアンピシリン入り LB プレートにまき、2nd スクリーニングを行なった。

同様にポジティブ部分を 10000 倍に希釈したサンプル 200 m l をアンピシリン入り LB プレートにまき、ライプラリーを作製し、このライプラリーを用いて 3rd スクリーニングを行なった。単離されたクローン (pSBBCD) はサブクローニングした後、定法に従って塩基配列を決定した。その配列を配列番号： 16 に示す。

前記配列中には、実施例 4 に記載のマウス肝臓由来のセラミダーゼ遺伝子と同一の配列を有する ORF が見出された。なお、5' 非翻訳領域及び 3' 非翻訳領

域の配列は、マウス肝臓由来のものとは異なっていた。また、単離されたプラスミド pSBCDを実施例5と同様にCHO細胞に導入したところ、該細胞においてセラミダーゼが発現されていることが確認された。

実施例7 ヒトのセラミダーゼ遺伝子のゲノムクローニング

実施例4で決定したマウス肝臓由来セラミダーゼ遺伝子の配列に基づき、配列表の配列番号：17に示す配列を有するセンスプライマーU1107及び配列表の配列番号：18に示す配列を有するアンチセンスプライマーL1311を合成した。U1107プライマーの配列は、配列表の配列番号：12の塩基番号：1107～1130の配列に相当し、L1311プライマーの配列は、配列番号：12の塩基番号：1311～1334の配列に相補的な塩基配列に相当する。

ヒト肝臓癌細胞Hu h 7からゲノムDNAを常法により精製した。得られたゲノムDNA 625ngを鋳型にU1107プライマー及びL1311プライマーを用いてPCRを行なった。PCRは、94°C、9分の後、94°C、0.5分～55°C、0.5分～72°C、3分を1サイクルとする40サイクルを行ない、さらに72°Cで7分保温する反応を行なった。ついで、得られた反応物をアガロースゲル電気泳動に供した結果、このPCRにより、約2kbpのDNA断片が増幅されたことが確認された。

このDNA断片をSephaglass（ファルマシア社製）を用いて、ゲルから回収し、得られた断片をpGEM-T easyベクター（プロメガ社製）に組込み、組換えプラスミドを構築した。ついで、得られたプラスミドの挿入DNA断片の塩基配列を決定した。前記配列は、GenBankのデータベースの登録されているAccession NO. AC012131 Componentの96289～98478に相当する配列であった。また、前記配列にコードされるアミノ酸配列の解析を行なったところ、配列表の配列番号：4で示されるマウス肝臓由来セラミダーゼアミノ酸配列のアミノ酸番号：370～444の

領域との相同性を示すアミノ酸配列をコードする領域が見出された。

なお、AC012131は、実施例4で決定されたマウス肝臓由来セラミダーゼ遺伝子とも相同性を有する。

配列表フリーテキスト

配列番号：1に示す配列において、アミノ酸番号：7、9及び13のXaaは不明のアミノ酸を示す。

配列番号：4は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。前記配列中、塩基番号：6、9及び15のnは、G、A、T又はCを示す。

配列番号：5は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。前記配列中、塩基番号：3、6及び15のnは、G、A、T又はCを示す。

配列番号：7は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：8は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：9は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：10は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：11は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：17は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：18は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。

産業上の利用可能性

本発明により、哺乳類由来の中性・アルカリ性セラミダーゼをコードする遺伝子が提供され、また、該遺伝子を用いるセラミダーゼの遺伝子工学的な製造方法が提供される。また、本発明のオリゴヌクレオチドプローブ及びプライマーは、前記遺伝子の検出に有用であり、生体内におけるセラミド代謝研究などに応用されうる。さらに、本発明により、本発明の遺伝子のアンチセンス核酸（DNA、RNA）が提供される。かかる遺伝子およびそのアンチセンス核酸は、生体内に

おけるセラミダーゼ活性の制御、セラミド代謝系の調節に有用であり、セラミド量の異常に起因する疾患の治療などへの応用が可能なセラミド量の調節方法が提供される。

請求の範囲

1. (A) 配列表の配列番号：14に記載のアミノ酸配列又はその一部を有してなるポリペプチドであって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；
(B) 配列表の配列番号：15に記載の塩基配列又はその一部を有する核酸であって、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；
(C) 配列表の配列番号：14に記載のアミノ酸配列において、少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換を有するアミノ酸配列からなり、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；
(D) 配列表の配列番号：15に記載の塩基配列において、少なくとも1つの塩基の欠失、付加、挿入又は置換を有する塩基配列からなり、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；並びに
(E) 前記(A)～(D)いずれか記載の核酸の相補鎖とストリンジェントな条件下にハイブリダイズしうる核酸であって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸、
(F) 縮重を介して、前記(A)～(E)いずれか記載の核酸とは異なる塩基配列を有する核酸であって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸、
からなる群より選択された核酸の塩基配列を有する遺伝子。

2. ポリペプチドのセラミダーゼ活性が、下記ステップ：

- (a) 遺伝子の発現産物を、反応混合液〔組成：20μlの25mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)中、550pmolのC12-NBD-セラミド、及び1.0% (W/V) コール酸ナトリウム〕中、37°Cで30分間インキュベートして反応させるステップ、並びに

(b) 得られた反応物について、C12-NBD-脂肪酸の生成を検出するステップ、
により検出されうる、請求項1記載の遺伝子。

3. ポリペプチドが、少なくとも下記性質：

- (i) 作用：セラミドを加水分解しスフィンゴイドと脂肪酸とを生成する；
- (ii) 基質特異性：N-アシルスフィンゴシンを加水分解する；ガラクトシルセラミド、スルファチド、GM1a、スフィンゴミエリンには作用しない；
- (iii) 至適pH：7.0～8.0である；
- (iv) 0.1% ポリドカノール (polidocanol) を含む20mMトリス-塩酸 (pH 7.5) 緩衝液中、37°C、24時間処理した場合には活性の低下は見られないが、60°C、1時間の処理により処理前の活性の約30%に活性が低下する；
を呈する、請求項1又は2記載の遺伝子。

4. 請求項1～3いずれか記載の遺伝子を含有してなる組換えDNA。

5. 請求項1～3いずれか記載の遺伝子又は請求項4記載の組換えDNAを含有してなる、微生物、動物細胞又は植物細胞用発現ベクター。

6. 請求項5記載の発現ベクターを保持してなる形質転換体。

7. セラミダーゼ遺伝子が発現され、かつ該遺伝子にコードされたポリペプチドの生産に適する条件下に、請求項6記載の形質転換体を培養し、得られた培養物からセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを採取することを特徴とする、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法。

8. 配列表の配列番号：14に記載のアミノ酸配列又はその一部を有してなるポリペプチドであって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチド。

9. 請求項1～3いずれか記載の遺伝子によりコードされてなる、セラミダーゼ活性を有するポリペプチド。

10. セラミダーゼ活性が、下記ステップ：

(a) 遺伝子の発現産物を、反応混合液〔組成：20μlの25mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)中、550pmolのC12-NBD-セラミド、及び1.0% (W/V) コール酸ナトリウム〕中、37°Cで30分間インキュベートして反応させるステップ、並びに

(b) 得られた反応物について、C12-NBD-脂肪酸の生成を検出するステップ、

により、検出されうる、請求項8又は9記載のポリペプチド。

11. 請求項1～3いずれか記載の遺伝子又はその一部に相補的なアンチセンスDNA。

12. 請求項1～3いずれか記載の遺伝子又はその一部に相補的なアンチセンスRNA。

13. 請求項11記載のアンチセンスDNAを含有してなる発現ベクター。

14. 請求項1～3いずれか記載の遺伝子又はその相補鎖に特異的にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマー。

15. 請求項 8～10 いずれか記載のポリペプチドに特異的に結合しうる抗体又はその断片。
16. 請求項 14 記載のオリゴヌクレオチドプローブ及び／又はプライマーを使用する、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の検出方法。
17. 請求項 14 記載のオリゴヌクレオチドプローブ及び／又はプライマーを含有してなる、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の検出に用いるためのキット。
18. 請求項 15 記載の抗体又はその断片を使用する、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの検出方法。
19. 請求項 15 記載の抗体又はその断片を含有してなるセラミダーゼ活性を有するポリペプチドの検出に用いるためのキット。
20. 請求項 1～3 いずれか記載の遺伝子又はそのアンチセンス核酸を細胞及び／又は組織に導入し、それにより細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量を調節することを特徴とする、細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量の調節方法。

第 1 図

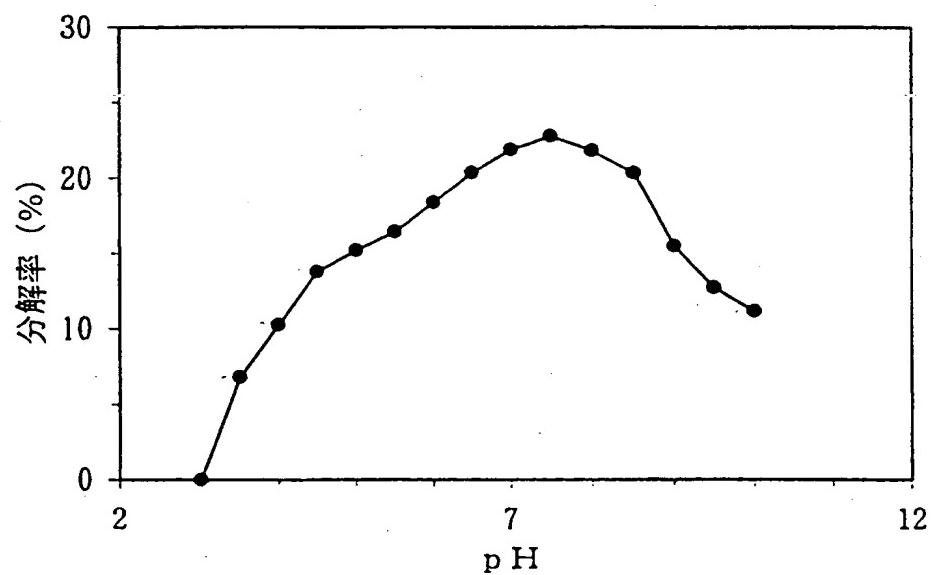
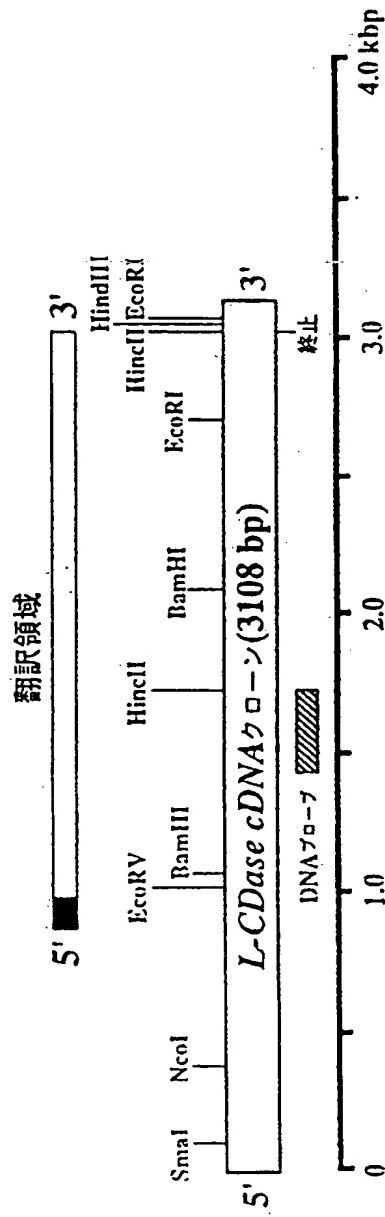


図 2



SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> A gene encoding ceramidase

<130> 00-011-PCT

<140> JP 11/84743

<141> 1999-3-26

<160> 18

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<222> 7, 9, 13

<223> Xaa is an unknown amino acid.

<400> 1

Phe Ser Gly Tyr Tyr Ile Xaa Val Xaa Arg Ala Asp Xaa Thr Gly

1

5

10

15

Lys Val Asn Asp Ile Asn

20

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<222> 9

<223> Xaa is an unknown amino acid.

<400> 2

Ala Ile Ala Thr Asp Thr Val Ala Xaa Met

1

5

10

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<222> 29, 30

<223> Xaa is an unknown amino acid.

<400> 3

Gly Tyr Leu Pro Gly Gln Gly Pro Phe Val Asn Gly Phe Ala Ser

1

5

10

15

Ser Asn Leu Gly Asp Val Ser Pro Asn Ile Leu Gly Pro Xaa Xaa

20

25

30

Val Asn Thr Gly Glu

35

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer.

<220>

<222> 6. 9. 15

<223> "n" is G or A or T or C.

<400> 4

carggnccnt tygtngc

17

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer.

<220>

<222> 3. 6. 15

<223> "n" is G or A or T or C.

<400> 5

ggnccnagda trttngg

17

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 6

gcaggcttg cttcatcaaa tctcgagac gtgtcacc 38

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer.

<400> 7

ttgatgaagc aaagcctgc 19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer

<400> 8

ggtgacacgt ctccgagat

19

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer

<400> 9

taatacgact cactataggg

20

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer

<400> 10

tctgctctaa aagctgc

17

<210> 11

<211> 3108

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 11

cctgcgccac ttctctctcc cggctcaatc gcggagccctt ttctctcccc cgtctcgccg 60
ctgccccat ctccacccct gcctgccccca ggggtctgtg gacgcccggg cagagagcaa 120
gcaccgagct gggctgctg gagaccggag accagcggcc cgcccccccg cccgctgcga 180
gcctcctgag cagctccgga acagcttact ttctgtttcc atctctttcg gaccgggttg 240
gcctctccaa aagccacttc tcctaactct tatcaagggtt caaaggctaa aggtctgtac 300
acatgagtgc tggtgtgctt agaggcatcg ggtccctttc agctggagtt gcagacttg 360
tgagtgccat ggaatccaaa ttccggcaaga gatacaatct aaactctcaa ctactccaga 420
ttcaagggttc acctcacttt ctggttacca aaggagcttt gcggggccgc tctgacatcc 480
agtagatttg gaaacacatt gagaaaatcag cctgagcaac ctgcaaggca caaggcacaa 540
gattctgcat ggttatttgc tctcccagga ggtgaacact tgttttgatt cacagagtca 600
gggtttagat gcccagttgt tcctcatctt ggctcagaag aagcacctag gaataaaagc 660
tctaagctgg tattaagtag aatgggctta aagtccacta cagggaaacaa cagctagtga 720
cagaaatggc aaagcgaacc ttctccaccc tggaggcatt cctcattttc cttctggtaa 780
taatgacagt catcacagtg gcccttctca ccctcttgc ttgttaccagt gggaccattg 840
aaaaccacaa agattcagga aatcacttgtt ttcaaccac tctgggtc acgacaaccc 900
agccccctcc aattacacag actccaaact tcccttcatt tcggaaacttc agtggctact 960
acattggcgt tggagagcg gattgcacag gacaagtgtc agatataat ttgatggct 1020
atggcaaaaa tggccagaat gcacgggtc tcctcaccag gctgttcagc cgtctttta 1080
tcttggcggaa tccagatggg tcaaattcgaa tggcatttgt gagcgtggaa ctatgtatga 1140
tttcccaacg actgagggttg gaggtcctga agagactaga gagtaaatat ggctctgt 1200
atcgaagaga caatgttatac ctgagtgcctt ttcacacaca ctctggccca gcagggttt 1260
tccaataatac actcttatata ctgcgccagcg agggattcag caaccggacc tttcagtaca 1320
tagtctctgg gatcatgaag agcattgata tagtcacac aaatctaaa ccaggcaaaaa 1380
tctttatcaa caaaggaaat gtgtctaatg tgcagatcaa ccgaagcccc tcctcttacc 1440
ttctgaatcc acagtcagag agagcaagg attctcaaa cacagacaag gaaatgctgg 1500
tcttggaaact ggtggatttg aatggagaag acttgggtct ttcagctgg tttgccatcc 1620
accccgtagcatgaacaat agcaaccact ttgtgaatag tgacaatatg ggctatgcgg 1680
cttaccttt tgagcaagaa aagaacaaag gctatctgcc tggacaggga ccgtttgttag 1680

caggcttgc ttcatcaaat ctcggagacg tgtcacccaa cattcttgc ccgcattgtg 1740
tcaacacagg ggagtcttgt gacaacgaca agagcacctg tcccaacggt gggcctagca 1800
tgtgcatggc cagcggacct ggacaagaca tgtttgagag cacacacatt ataggacgga 1860
tcatctatca gaaggccaag gagctgtatg cctctgcctc ccaggaggta accggcccag 1920
tgcttgcatgc tcaccagtgg gtgaacatga cagatgttag cgtagcgtc aatgccacac 1980
acacagtgaa gacgtgtaaa cctgcccctgg gctacagtt tgccgcaggc acaattgtatg 2040
gagtttcggg cctcaatatt acacaggaa ctacggaagg ggatccattc tgggacactc 2100
ttcgggacca gctcttggg aaaccatctg aagagattgt agagtgttag aaacccaaac 2160
caatccgtct tcacagtggg gagctgacga taccacatcc ttggcaacca gatattgttg 2220
atgttcagat tgtaaccgtt gggtccttgg ccatacgatgc tateeetggg gaatttaacaa 2280
ccatgtcggg acgaagattt cgtgaggca ttaaaaaaga atttgcattt tatggatga 2340
aggatatgac cgttgttac gcaggtctaa gcaatgttta tacacattac attaccacat 2400
atgaagaata ccaggctcag cggtacgagg cagcatctac aatctatggg ccacacaccc 2460
tgtctgcata catccaaactc ttcaagagacc ttgctaaggc aattgctacg gacacagtag 2520
ccaacatgag cagtggcccc gagcctccat tcttcaaaaa tctaatacgat tcacttattc 2580
ctaataattgc ggatagagca ccaattggca aacattttgg ggtatgtcttgc cagccagcaa 2640
aacctgaata cagagtgggaa gaagtgggtt aagtatatt tggatggcgtt aacccaaaga 2700
attcagcaga gaaccagacc catcaaacct tcctcactgt ggagaaatac gaggactctg 2760
tagctgactg gcagataatg tataacgatg ctcctgggaa gacgaggattt tattggcaca 2820
aaggaataact gggctgagc aatgcaacaa tatactggca tattccagat actgcctacc 2880
ctggaatctt cagaataaga tattttggac acaatcgaa gcaggaactt ctgaaaccccg 2940
ctgtcataact agcatttgaa ggaatttctt ctccttttga agttgtcact acttagtgaa 3000
aagtgtacag atattgaaga aaagcttttc tctgtgcaca ttatagatgt aattcacaaa 3060
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa 3108

<210> 12

<211> 2271

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 12

atggcaaagc gaaccttctc caccttgag gcattcctca tttcccttct ggtaataatg 60
acagtcatca cagtggccct tctcaccctc ttgttgtt ccagtggac cattgaaaac 120
cacaaagatt caggaaatca ctggtttca accactctgg gtcacgcac aacccagccc 180
cctccaatta cacagactcc aaacttcct tcattcgga acttcagtgg ctactacatt 240
ggcggtggga gagcggattg cacaggacaa gtgtcagata tcaatttgat gggctatggc 300
aaaaatggcc agaatgcacg gggtctcctc accaggctgt tcagccgtgc ttttatctg 360
gcggatccag atgggtcaaa tcgaatggca tttgtgagcg tggaactatg tatgatttcc 420
caacgactga ggttggaggt cctgaagaga cttagagatg aatatggctc tctgtatcga 480
agagacaatg ttatcctgag tgccattcac acacactctg gcccagcagg gttttccaa 540
tatacactct atatactcgc cagcgaggga ttcaagcaacc ggaccttca gtacatagtc 600
tctggatca tgaagagcat tgatatactg cacacaaatc ttaaaccagg caaaatctt 660
atcaacaaag gaaatgttgc taatgtgcag atcaacccaa gcccctcctc ttaccttctg 720
aatccacagt cagagagagc aaggtattct tcaaacacag acaaggaaat gctggtctg 780
aaacttgtgg atttgaatgg agaagacttg ggtcttatca gctggtttgc catccacccc 840
gtgagcatga acaatagcaa ccacttttg aatagtgaca atatggcta tgccgcttac 900
cttttgagc aagaaaagaa caaaggctat ctgcctggac agggaccgtt tgtagcaggc 960
tttgcttcat caaatctcg agacgtgtca cccaacattc ttggcccgca ttgtgtcaac 1020
acaggggagt ctttgacaa cgacaagagc acctgtccca acggtgggcc tagcatgtgc 1080
atggccagcg gacctggaca agacatgtt gagagcacac acattatagg acggatcatc 1140
tatcagaagg ccaaggagct gtatgcctt gcctccagg aggtgaccgg cccagtgcctt 1200
gcagctcacc agtgggtgaa catgacagat gtgagcgtcc agctcaatgc cacacacaca 1260
gtgaagacgt gtaaacctgc cctggctac agtttgccg caggcacaat tgatggagtt 1320
tcgggcctca atattacaca gggaaactacg gaaggggatc cattctggga cactctcgg 1380
gaccagctct tggaaaacc atctgaagag attgttagagt gtcagaaacc caaaccaatc 1440
ctgcttaca gtggagagct gacgatacca catccttggc aaccagatat tggatgttt 1500
cagattgttia ccgttgggtc cttggccata gctgctatcc ctggggattt aacaaccatg 1620
tcgggacgaa gattcgtga ggcaattaaa aaagaatttg cactttatgg gatgaaggat 1620

atgaccgttg ttatcgagg tctaagcaat gttatacac attacattac cacatatgaa 1680
 gaataccagg ctcagcggtt cgaggcagca tctacaatct atggaccaca caccctgtct 1740
 gcatacatcc aactcttcag agaccttgct aaggcaattt ctacggacac agtagccaac 1800
 atgagcagtg gtcccgagcc tccattcttc aaaaatctaa tagcttcact tattcctaatt 1860
 attgcggata gggcaccaat tggcaaacat tttggggatg tcttgcagcc agcaaaacct 1920
 gaatacagag tggagaagt ggttgaagtt atatitgttag gcgctaacc aagaattca 1980
 gcagagaacc agacccatca aacccatcc actgtggaga aatacgagga ctctgttagct 2040
 gactggcaga taatgtataa cgatgcctcc tggagacga gttttattt gcacaaagga 2100
 atactggtc tgagcaatgc aacaatatac tggcatattt cagatactgc ctaccctgga 2160
 atctacagaa taagatattt tggacacaat cggaaggcagg aacttctgaa acccgctgtc 2220
 atactagcat ttgaaggaat ttcttcct tttgaagttt tcactactta g 2271

<210> 13

<211> 756

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 13

Met Ala Lys Arg Thr Phe Ser Thr Leu Glu Ala Phe Leu Ile Phe

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Leu Val Ile Met Thr Val Ile Thr Val Ala Leu Leu Thr Leu

20	25	30
----	----	----

Leu Phe Val Thr Ser Gly Thr Ile Glu Asn His Lys Asp Ser Gly

35	40	45
----	----	----

Asn His Trp Phe Ser Thr Thr Leu Gly Ser Thr Thr Gln Pro

50	55	60
----	----	----

Pro Pro Ile Thr Gln Thr Pro Asn Phe Pro Ser Phe Arg Asn Phe

65	70	75
----	----	----

Ser Gly Tyr Tyr Ile Gly Val Gly Arg Ala Asp Cys Thr Gly Gln

80	85	90
Val Ser Asp Ile Asn Leu Met Gly Tyr Gly Lys Asn Gly Gln Asn		
95	100	105
Ala Arg Gly Leu Leu Thr Arg Leu Phe Ser Arg Ala Phe Ile Leu		
110	115	120
Ala Asp Pro Asp Gly Ser Asn Arg Met Ala Phe Val Ser Val Glu		
125	130	135
Leu Cys Met Ile Ser Gln Arg Leu Arg Leu Glu Val Leu Lys Arg		
140	145	150
Leu Glu Ser Lys Tyr Gly Ser Leu Tyr Arg Arg Asp Asn Val Ile		
155	160	165
Leu Ser Ala Ile His Thr His Ser Gly Pro Ala Gly Phe Phe Gln		
170	175	180
Tyr Thr Leu Tyr Ile Leu Ala Ser Glu Gly Phe Ser Asn Arg Thr		
185	190	195
Phe Gln Tyr Ile Val Ser Gly Ile Met Lys Ser Ile Asp Ile Ala		
200	205	210
His Thr Asn Leu Lys Pro Gly Lys Ile Phe Ile Asn Lys Gly Asn		
215	220	225
Val Ala Asn Val Gln Ile Asn Arg Ser Pro Ser Ser Tyr Leu Leu		
230	235	240
Asn Pro Gln Ser Glu Arg Ala Arg Tyr Ser Ser Asn Thr Asp Lys		
245	250	255
Glu Met Leu Val Leu Lys Leu Val Asp Leu Asn Gly Glu Asp Leu		
260	265	270
Gly Leu Ile Ser Trp Phe Ala Ile His Pro Val Ser Met Asn Asn		
275	280	285
Ser Asn His Phe Val Asn Ser Asp Asn Met Gly Tyr Ala Ala Tyr		
290	295	300

Leu Phe Glu Gln Glu Lys Asn Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Gln Gly
305 310 315
Pro Phe Val Ala Gly Phe Ala Ser Ser Asn Leu Gly Asp Val Ser
320 325 330
Pro Asn Ile Leu Gly Pro His Cys Val Asn Thr Gly Glu Ser Cys
335 340 345
Asp Asn Asp Lys Ser Thr Cys Pro Asn Gly Gly Pro Ser Met Cys
350 355 360
Met Ala Ser Gly Pro Gly Gln Asp Met Phe Glu Ser Thr His Ile
365 370 375
Ile Gly Arg Ile Ile Tyr Gln Lys Ala Lys Glu Leu Tyr Ala Ser
380 385 390
Ala Ser Gln Glu Val Thr Gly Pro Val Leu Ala Ala His Gln Trp
395 400 405
Val Asn Met Thr Asp Val Ser Val Gln Leu Asn Ala Thr His Thr
410 415 420
Val Lys Thr Cys Lys Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Phe Ala Ala Gly
425 430 435
Thr Ile Asp Gly Val Ser Gly Leu Asn Ile Thr Gln Gly Thr Thr
440 445 450
Glu Gly Asp Pro Phe Trp Asp Thr Leu Arg Asp Gln Leu Leu Gly
455 460 465
Lys Pro Ser Glu Glu Ile Val Glu Cys Gln Lys Pro Lys Pro Ile
470 475 480
Leu Leu His Ser Gly Glu Leu Thr Ile Pro His Pro Trp Gln Pro
485 490 495
Asp Ile Val Asp Val Gln Ile Val Thr Val Gly Ser Leu Ala Ile
500 505 510
Ala Ala Ile Pro Gly Glu Leu Thr Thr Met Ser Gly Arg Arg Phe

515	520	525
Arg Glu Ala Ile Lys Lys Glu Phe Ala Leu Tyr Gly Met Lys Asp		
530	535	540
Met Thr Val Val Ile Ala Gly Leu Ser Asn Val Tyr Thr His Tyr		
545	550	555
Ile Thr Thr Tyr Glu Glu Tyr Gln Ala Gln Arg Tyr Glu Ala Ala		
560	565	570
Ser Thr Ile Tyr Gly Pro His Thr Leu Ser Ala Tyr Ile Gln Leu		
575	580	585
Phe Arg Asp Leu Ala Lys Ala Ile Ala Thr Asp Thr Val Ala Asn		
590	595	600
Met Ser Ser Gly Pro Glu Pro Pro Phe Phe Lys Asn Leu Ile Ala		
605	610	615
Ser Leu Ile Pro Asn Ile Ala Asp Arg Ala Pro Ile Gly Lys His		
620	625	630
Phe Gly Asp Val Leu Gln Pro Ala Lys Pro Glu Tyr Arg Val Gly		
635	640	645
Glu Val Val Glu Val Ile Phe Val Gly Ala Asn Pro Lys Asn Ser		
650	655	660
Ala Glu Asn Gln Thr His Gln Thr Phe Leu Thr Val Glu Lys Tyr		
665	670	675
Glu Asp Ser Val Ala Asp Trp Gln Ile Met Tyr Asn Asp Ala Ser		
680	685	690
Trp Glu Thr Arg Phe Tyr Trp His Lys Gly Ile Leu Gly Leu Ser		
695	700	705
Asn Ala Thr Ile Tyr Trp His Ile Pro Asp Thr Ala Tyr Pro Gly		
710	715	720
Ile Tyr Arg Ile Arg Tyr Phe Gly His Asn Arg Lys Gln Glu Leu		
725	730	735

Leu Lys Pro Ala Val Ile Leu Ala Phe Glu Gly Ile Ser Ser Pro
740 745 750
Phe Glu Val Val Thr Thr
755

<210> 14

<211> 682

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 14

Phe Ser Gly Tyr Tyr Ile Gly Val Gly Arg Ala Asp Cys Thr Gly

1 5 10 15

Gln Val Ser Asp Ile Asn Leu Met Gly Tyr Gly Lys Asn Gly Gln

20 25 30

Asn Ala Arg Gly Leu Leu Thr Arg Leu Phe Ser Arg Ala Phe Ile

35 40 45

Leu Ala Asp Pro Asp Gly Ser Asn Arg Met Ala Phe Val Ser Val

50 55 60

Glu Leu Cys Met Ile Ser Gln Arg Leu Arg Leu Glu Val Leu Lys

65 70 75

Arg Leu Glu Ser Lys Tyr Gly Ser Leu Tyr Arg Arg Asp Asn Val

80 85 90

Ile Leu Ser Ala Ile His Thr His Ser Gly Pro Ala Gly Phe Phe

95 100 105

Gln Tyr Thr Leu Tyr Ile Leu Ala Ser Glu Gly Phe Ser Asn Arg

110 115 120

Thr Phe Gln Tyr Ile Val Ser Gly Ile Met Lys Ser Ile Asp Ile

125 130 135

Ala His Thr Asn Leu Lys Pro Gly Lys Ile Phe Ile Asn Lys Gly
140 145 150
Asn Val Ala Asn Val Gln Ile Asn Arg Ser Pro Ser Ser Tyr Leu
155 160 165
Leu Asn Pro Gln Ser Glu Arg Ala Arg Tyr Ser Ser Asn Thr Asp
170 175 180
Lys Glu Met Leu Val Leu Lys Leu Val Asp Leu Asn Gly Glu Asp
185 190 195
Leu Gly Leu Ile Ser Trp Phe Ala Ile His Pro Val Ser Met Asn
200 205 210
Asn Ser Asn His Phe Val Asn Ser Asp Asn Met Gly Tyr Ala Ala
215 220 225
Tyr Leu Phe Glu Gln Glu Lys Asn Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Gln
230 235 240
Gly Pro Phe Val Ala Gly Phe Ala Ser Ser Asn Leu Gly Asp Val
245 250 255
Ser Pro Asn Ile Leu Gly Pro His Cys Val Asn Thr Gly Glu Ser
260 265 270
Cys Asp Asn Asp Lys Ser Thr Cys Pro Asn Gly Gly Pro Ser Met
275 280 285
Cys Met Ala Ser Gly Pro Gly Gln Asp Met Phe Glu Ser Thr His
290 295 300
Ile Ile Gly Arg Ile Ile Tyr Gln Lys Ala Lys Glu Leu Tyr Ala
305 310 315
Ser Ala Ser Gln Glu Val Thr Gly Pro Val Leu Ala Ala His Gln
320 325 330
Trp Val Asn Met Thr Asp Val Ser Val Gln Leu Asn Ala Thr His
335 340 345
Thr Val Lys Thr Cys Lys Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Phe Ala Ala

350	355	360
Gly Thr Ile Asp Gly Val Ser Gly Leu Asn Ile Thr Gln Gly Thr		
365	370	375
Thr Glu Gly Asp Pro Phe Trp Asp Thr Leu Arg Asp Gln Leu Leu		
380	385	390
Gly Lys Pro Ser Glu Glu Ile Val Glu Cys Gln Lys Pro Lys Pro		
395	400	405
Ile Leu Leu His Ser Gly Glu Leu Thr Ile Pro His Pro Trp Gln		
410	415	420
Pro Asp Ile Val Asp Val Gln Ile Val Thr Val Gly Ser Leu Ala		
425	430	435
Ile Ala Ala Ile Pro Gly Glu Leu Thr Thr Met Ser Gly Arg Arg		
440	445	450
Phe Arg Glu Ala Ile Lys Lys Glu Phe Ala Leu Tyr Gly Met Lys		
455	460	465
Asp Met Thr Val Val Ile Ala Gly Leu Ser Asn Val Tyr Thr His		
470	475	480
Tyr Ile Thr Thr Tyr Glu Glu Tyr Gln Ala Gln Arg Tyr Glu Ala		
485	490	495
Ala Ser Thr Ile Tyr Gly Pro His Thr Leu Ser Ala Tyr Ile Gln		
500	505	510
Leu Phe Arg Asp Leu Ala Lys Ala Ile Ala Thr Asp Thr Val Ala		
515	520	525
Asn Met Ser Ser Gly Pro Glu Pro Pro Phe Phe Lys Asn Leu Ile		
530	535	540
Ala Ser Leu Ile Pro Asn Ile Ala Asp Arg Ala Pro Ile Gly Lys		
545	550	555
His Phe Gly Asp Val Leu Gln Pro Ala Lys Pro Glu Tyr Arg Val		
560	565	570

Gly Glu Val Val Glu Val Ile Phe Val Gly Ala Asn Pro Lys Asn
 575 580 585
 Ser Ala Glu Asn Gln Thr His Gln Thr Phe Leu Thr Val Glu Lys
 590 595 600
 Tyr Glu Asp Ser Val Ala Asp Trp Gln Ile Met Tyr Asn Asp Ala
 605 610 615
 Ser Trp Glu Thr Arg Phe Tyr Trp His Lys Gly Ile Leu Gly Leu
 620 625 630
 Ser Asn Ala Thr Ile Tyr Trp His Ile Pro Asp Thr Ala Tyr Pro
 635 640 645
 Gly Ile Tyr Arg Ile Arg Tyr Phe Gly His Asn Arg Lys Gln Glu
 650 655 660
 Leu Leu Lys Pro Ala Val Ile Leu Ala Phe Glu Gly Ile Ser Ser
 665 670 675
 Pro Phe Glu Val Val Thr Thr
 680

<210> 15

<211> 2049

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 15

```

ttcagtggct actacattgg cgttggaga gcggattgca caggacaagt gtcagatatc 60
aatttcatgg gctatggcaa aaatggccag aatgcacggg gtctcctcac caggctgtc 120
agccgtgc ttatcttggc ggatccagat gggtaaaatc gaatggcatt tgtgagcgtg 180
gaactatgt tggatccca acgactgagg ttggaggatcc tgaagagact agagagtaaa 240
tatggctctc tgtatcgaaag agacaatgtt atcctgagtg ccattcacac acactctggc 300
ccagcagggt tttccaata tacactctat atactcgcca gcgaggatt cagcaaccgg 360

```

accttcagt acatagtctc tgggatcatg aagagcattg atatacgctca cacaatctt 420
aaaccaggca aaatctttat caacaaagga aatgttgcta atgtgcagat caaccgaagc 480
ccctccctt accttctgaa tccacagtca gagagagcaa ggtattcttc aaacacagac 540
aaggaaatgc tggcttgaa actggtgat ttgaatggag aagacttggg tcttatcagc 600
tggtttgcctt tccaccccggt gaggcatgaac aatagcaacc actttgtgaa tagtgacaat 660
atgggcatacg cggttacact ttttggcaaa gaaaagaaca aaggctatct gcctggacag 720
ggaccgtttg tagcaggctt tgcttcatca aatctcgag acgtgtcacc caacattctt 780
ggcccgccatt gtgtcaacac aggggagtct tgtgacaacg acaagagcac ctgtcccaac 840
ggtgtggctta gcatgtgcat ggccagcgga cctggacaag acatgttga gagcacacac 900
attataggac ggatcatcta tcagaaggcc aaggagctgt atgcctctgc ctcccaggag 960
gtgaccggcc cagtgcctgc agctcaccag tgggtgaaca tgacagatgt gagcgtccag 1020
ctcaatgccca cacacacagt gaagacgtgt aaacctgccc tggctacag tttgccgca 1080
ggcacaattt atggagtttcc gggcctcaat attacacagg gaactacgga agggatcca 1140
ttctgggaca ctctcggga ccagctcttggaa gaaaaaccat ctgaagagat tgttagtgt 1200
cagaaaccca aaccaatccct gcttcacagt ggagagctga cgataccaca tccttggcaa 1260
ccagatattt ttagtgcata gattgttacc gttgggtcct tggccatagc tgctatccct 1320
ggggaaattaa caaccatgtc gggacgaaga tttcgtgagg caattaaaaa agaatttgca 1380
ctttatggga tgaaggatat gaccgttgc atcgcaggc taagcaatgt ttatacacat 1440
tacattacca catatgaaga ataccaggct cagcggtacg aggccatcatacata 1500
ggaccacaca ccctgtctgc atacatccaa ctcttcagag accttgcataa ggcaattgct 1560
acggacacag tagccaaacat gagcagtggt cccgagcctc cattttcaaa aaatctaata 1620
gcttcactta ttcttaatat tgcggataga gcaccaattt gcaaacatgt tgggatgtc 1680
ttgcagccag caaaacctga atacagatgt ggagaagtgg tgaagttat attttaggc 1740
gctaacccaa agaattcagc agagaaccag acccatcaaa ctttcctcac tgtggagaaa 1800
tacgaggact ctgttagctga ctggcagata atgtataacg atgcctcctg ggagacgagg 1860
ttttattggc acaaaggaat actgggtctg agcaatgcaa caatatactg gcatattcca 1920
gatactgcctt accctggaaat ctacagaata agatattttg gacacaatcg gaagcaggaa 1980
cttctgaaac ccgctgtcat actagcattt gaaggaattt ctttcctt tgaagttgtc 2040
actacttag

<210> 16

<211> 4835

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 16

cctgcagcgg ttttgcggcaggatcacacaggatcccag caggcactct 60
gggttgcggcggatcgatgatatgcgggg gtttgaatga gcagctgcag cagcgggttt 120
gggtctgtac acatgagtgc tggtgtgc tt agaggcatcg ggtcccttttc agctggagtt 180
gcagtttg tgagtgccat atttggaaac acattgagaa atcagcctga gcaacctgca 240
aggcacaagg cacaagattc tgcatggta ttgcctc caggaggtga acactttttt 300
tgattaacag agtcagggtt gagatgccca gttgttcctc atcttggctc agaagaagca 360
ccttaggaata aaagctctaa gctggtattt agtagaatgg gcttaaagtc cactacagga 420
aacaacagct agtgcacagaa atggcaaagc gaaccttctc caccttggag gcattcctca 480
ttttccttctt ggtataatg acagtcatca cagtggccct tctcaccctc ttgtttgtta 540
ccagtggac cattgaaaac cacaagattt caggaatca ctggtttca accactctgg 600
gctccacgac aacccagccc cctccaattt cacagactcc aaacttccct tcatttcgga 660
acttcagtgg ctactacatt ggcgttggga gagcagattt cacaggacaa gtgtcagata 720
tcaatttgat gggctatggc aaaaatggcc agaatgcacg gggcttcctc accaggctgt 780
tcagccgtgc ttttatcttgc gggatccag atgggtcaaa tcgaatggca ttgtgagcgt 840
tggaaactatg tatgatttcc caacgactga ggttggaggt cctgaagaga ctagagagta 900
aatatggctc tctgtatcga agagacaatg ttatcctgag tgccattcac acacactctg 960
gccccagcagg gttttccaa tatacactt atatactcgc cagcgaggga tttagcaacc 1020
ggaccttca gtacatagtc tctggatca tgaagagcat tgatatacg cacacaaatc 1080
ttaaaccagg caaaatctt atcaacaaag gaaatgttgc taatgtgcag atcaaccgaa 1140
gcccccttc ttaccttctg aatccacagt cagagagacg aaggatttct tcaaacacag 1200
acaaggaaat gctggtcttgc aaactggtgg atttgaatgg agaagacttg ggttttatca 1260
gctggtttgc catccaccccc gtgagcatga acaatagcaa ccactttgtg aatagtgaca 1320

atatgggcta tgcggcttac cttttgagc aagaaaagaa caaaggctat ctgcctggac 1380
agggaccgtt ttagcaggc ttgcgtcat caaatctcg agacgtgtca cccaacattc 1440
ttggcccgca ttgtgtcaac acagggagt cttgtgacaa cgacaagagc acctgtccc 1500
acggtgggcc tagcatgtgc atggccagcg gacctggaca agacatgtt gagagcacac 1560
acattatagg acggatcatc tatcagaagg ccaaggagct gtatgcctct gcctccagg 1620
aggtgaccgg cccagtgctt gcagctcacc agtgggtgaa catgacagat gtgagcgtcc 1680
agctcaatgc cacacacaca gtgaagacgt gttaaacctgc cctggctac agtttgccg 1740
caggcacaat tgatggagtt tcgggcctca atattacaca gggactacg gaaggggatc 1800
cattctggga cactcttcgg gaccagctct tggaaaacc atctgaagag atttagagt 1860
gtcagaaacc caaaccaatc ctgcctcaca gtggagagct gacgatacca catccttgcc 1920
aaccagatat tggatgtt cagatttta ccgttgggtc cttggccata gctgctatcc 1980
ctgggaatt aacaaccatg tcgggacgaa gatttcgtga ggcaattaaa aaagaatttg 2040
cacttatgg gatgaaggat atgaccgttg ttatgcagg tctaagcaat gtttatacac 2100
attacattac cacatatgaa gaataccagg ctcagcggta cgaggcagca tctacaatct 2160
atggaccaca caccctgtct gcatacatcc aactcttcag agaccttgct aaggcaattg 2220
ctacggacac agtagccaac atgagcagtgt gtcccgagcc tccattcttc aaaaatctaa 2280
tagcttact tattcctaattt attgcggata gagcaccaat tggcaaacat ttggggatg 2340
tcttgccagcc agaaaaacctt gaatacagag tgggagaagt gttgaagtt atatttgt 2400
gctctaaccctt aaagaattca gcagagaacc agacccatca aaccccttc actgtggaga 2460
aatacgagga ctctgttagct gactggcaga taatgtataa cgtgcctcc tggagacga 2520
ggttttatttgcacaaagga atactgggtc tgagcaatgc aacaatatac tggcatattc 2580
cagatactgc ctaccctgga atctacagaa taagatattt tggacacaat cggaagcagg 2640
aacttctgaa acccgctgtc atactagcat ttgaaggaat ttcttcctt tttgaagtt 2700
tcactactta gtggaaatgtt gacagatattt gaagaaaagc tttctctgt gcacattata 2760
gagtgaatttgcacaaatgtt gaactgccag tttaatttctt gtaattgtct ctgtttgggg 2820
gacaggtcat ttattgctaa tgggacagag gtatgtgtt gtgttgtt atgattatga 2880
gtatgcattgc taacaggaag agagagggag gagggaggga ggagggggag ggagggaaaga 2940
aaggagggag agagagagttagagaaatgagagagatg agagagaaag agttattatgt 3000
gagcaagaga atatgagaga agggccactg acaaccaat accttgtat ctttatccata 3060

aagcatgatt ttcccttgaag ctctgtggtt gtttaagaga taattccctc taatatgaaa 3120
tccctgaaat ataatgacag tatttgaaga tatgtgaata atgttatcc tatttattta 3180
tagacttact aaatgagaac actagagaac tttctagaag tcctctagaa tgatacttga 3240
ttttacagag agaaaaaggaa gctttagttt ctttaggtt agaataaggt tagtatattt 3300
ttccctagtc atatttacaa aataccatgt aactttacta caaatattt agcccgacta 3360
aaatataccc agaaaattt tagtaccatgtt ttgtttttttt ttatattttttt tttgcattca 3420
aacaaggata gtccttctga taagtcaactt tagaatggat ctgcctggct cagggttattt 3480
gttcatgctc agatcatttc cgcaatttacc tccagagtcc aactatgoga atgtcaactt 3540
cagtgccttg atttatgcct tgtattccctc aaagtgtcct tattctgccta agtcacacct 3600
cttcctccca gcattttactc taaaatgattt ttaatgtttt cgccaaatcaa atgtacactca 3660
cattacaaag cttgccttg aatgttagatt tttaaaacaa aagtgttaag gctggaaatg 3720
tagttatcaa agaggaagtt ttaaatgtat ctgttctttt atcagctact ccctccctca 3780
tggctccctt gaatcaactga atagtttattt aaacccacat atccaatatg gtactcattt 3840
ctgggtcttc acaatttacag acatcatatc gaaatgattt ggctgacaat tccttgaag 3900
gacaaagtaa atatttaatg agaaatatag attctggaga ggcatttgaat aatcacaaat 3960
gttacgcctc catttcctgt ttccaggct gggtgttctg atttgggagg aaagcagccc 4020
caaataattt ttaaatatga atctgaaaat aatgttttag aaattatgtat ctgcacagtc 4080
taattaatga gaattgtctg aaagtcctag ctgcatttaa aattatgtaa gttaactaaa 4140
gcccaattttt gaaccccaagt cataatttgt tagtaggtt aaaaagagcat tttaggagga 4200
aaccgaaactt cattcaaga ctgaatctgt tttaaaagaa caatagtgtt aaggtaaatc 4260
ttcattttt tccctatggt ttaccttattt aaacatcgaa gattgaatca aaaggcacct 4320
ggagcatatt ttggtaactc catttccccac ttggtagttc tatggatgct aactgctgaa 4380
gaataaaactg atcgggattt tcaagggttg tgaacatgtc tcctgtatggg aataccgtat 4440
taagtataaa ggttcaaaat agttgatctc aaaactatac acacacacac aatatatata 4500
tatatacaca cacacacatg tacacacaca cacacatgca catacacatg gtattgttta 4560
aaatttattt ctcatgactt agaacaatat aaggattata caaggattca ttcccacca 4620
tcattccctcc cagtgaagct ttctcaaag tctgagtagg agtttctcct ttctcaactgg 4680
taactatccc acagtggcca ttacatcaact agtaatcggt gtgcccagcc ctgcatggaa 4740
ataaaatcaca gaaacataat ttcccagtag acttagtctc ttcaaggctg tttgtttctca 4800

gtgtataaaa tctgtaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaa

4835

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer

<400> 17

gtttgagagc acacacatta tagg

24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer

<400> 18

atattgaggc ccgaaactcc atca

24